



Programa de Doctorado
en Biociencias Moleculares

**Caracterización de la función
de SRSF3 en la homeostasis del
corazón y en el infarto de
miocardio**

Paula Ortiz Sánchez

Madrid, 2018

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias



Caracterización de la función de SRSF3 en la homeostasis del corazón y en el infarto de miocardio

Paula Ortiz Sánchez

Licenciada en Biotecnología

Dirigida por Dr. Enrique Lara-Pezzi

Fundación Centro Nacional de Investigaciones
Cardiovasculares Carlos III (CNIC)

Certificado del Director:

Dr. Enrique Lara Pezzi, Jefe de Grupo en la Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III.

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral titulada "**Caracterización de la función de SRSF3 en la homeostasis del corazón y en el infarto de miocardio**" presentada por Paula Ortiz Sánchez, ha sido realizada bajo mi tutela y dirección, autorizándose para presentación ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Madrid, a 9 de Mayo de 2018.

Fdo. Enrique Lara Pezzi

AGRADECIMIENTOS

Aunque yo aparezca como autora de esta tesis, hay muchas personas sin las que este proyecto no hubiese salido adelante y a las que quiero mostrar mi profundo agradecimiento y gratitud. Imprescindible mencionar al director de esta tesis, el Dr. Enrique Lara-Pezzi. En primer lugar por seleccionarme, primero para hacer las prácticas de verano y después para hacer la tesis en su laboratorio. Durante estos años me ha enseñado a ser buena científica, tanto en el diseño, análisis y replanteamiento de experimentos, como en la transmisión de los resultados, con la preparación de manuscritos, pósters y presentaciones. También le quiero agradecer sus consejos de cómo enfrentarme a la vida laboral y continuar mi carrera después de la tesis. Y aunque piense que nunca le hago caso, siempre he tenido en cuenta todas sus sugerencias y su ayuda ha sido imprescindible para que este proyecto fuera un éxito.

El laboratorio ha cambiado mucho en los más de 4 años que llevo en él, pero siempre ha habido una constante. Marina, compañera con la que he forjado una gran amistad, gracias a quien esta experiencia ha sido única. Porque ha sido la persona que ha estado conmigo desde el primer día hasta el último, que me enseñó a dar mis primeros pasos en el laboratorio y me ha ayudado con multitud de experimentos. Pero sobre todo, porque consigue que cualquier sitio en el que esté, ya sea el laboratorio o fuera, esté lleno de risas y buenos momentos. Poco después de comenzar la tesis llegó Javi, mi compañero de tesis. Juntos hemos recorrido la tesis casi a la vez, por lo que hemos compartido muchas experiencias, pasando muy buenos momentos y también compartiendo muchas frustraciones sobre experimentos fallidos, pero sabiendo superarlas siempre. Eli, siempre con una sonrisa y una palabra amable, también ha sido un gran apoyo durante los últimos años, con muchas conversaciones tanto dentro como fuera de la ciencia. A Carlos, agradecerle todas sus aportaciones y ayuda con los temas bioinformáticos. Mucho tengo que agradecerle a María, quien me ha enseñado todo lo que sé sobre

ecocardiografías y por estar siempre dispuesta a echar una mano. Gracias también a Fernando, por estar siempre dispuesto a ayudar, discutiendo resultados y aportando ideas desde su punto de vista más clínico. También me gustaría agradecer a las incorporaciones más recientes. Laura, a quien he estado ayudando en el comienzo de su proyecto, al igual que ella me ha ayudado con algunos de mis experimentos. Y María, que también me ha echado una mano en algunos experimentos. Os voy a echar mucho de menos y mi día a día será un poco menos alegre sin vosotros a mi lado.

No me puedo olvidar tampoco de las personas que han pasado por el laboratorio y ayudaron con sus aportaciones, como Laura, Alberto, Girolamo y Enda. En especial me gustaría dar las gracias a Jesús, que tanto en el tiempo que estuvo aquí como el que lleva fuera, siempre ha estado dispuesto a ayudar y aconsejar para las cosas fueran lo mejor posible. Y Miriam, que aunque su estancia en el laboratorio fuera corta, fue más que suficiente para crear un vínculo de amistad que se mantiene y quien siempre está con una sonrisa dispuesta a ayudarte en lo que pueda.

Pero no solo los compañeros del laboratorio han sido imprescindibles para la realización de esta tesis. Hay mucha gente que está o ha pasado por este centro con la que se ha formado un grupo ideal tanto para discutir experimentos y resultados como para tomarse un descanso, pasar un buen rato y recuperar fuerzas para seguir adelante. En especial a Jose, quien a pesar de no estar en nuestro grupo (pero casi), se ha hecho querer y ha sido un constante en los últimos años. Siempre es un placer hablar con él, ya sea de ciencia o de cualquier otro tema.

Muchas gracias también a todas las unidades técnicas, cuyo papel ha sido esencial en la obtención de resultados claves para esta tesis. En especial a Frank, Laura y Lorena que han estado a cargo de las colonias de ratones durante este tiempo. Mucho tengo que agradecer también al panel seleccionador de las becas La Caixa-Severo Ochoa 2014 por confiar en mí y otorgarme una de esas becas, la cual me ha permitido realizar la tesis en un centro tan extraordinario como este.

Me gustaría agradecer también a quien fue mi primer tutor, Jaime Carvajal. Recién aterrizado de Inglaterra me acogió en su laboratorio en el que empecé mi carrera en investigación. Además, fue una de las personas que me animó a mudarme a Madrid para tener la oportunidad de hacer una buena tesis.

Tan importante es el apoyo de la gente que conoces en el trabajo como aquellos que han seguido a tu lado desde hace muchos años. A mis amigos de la universidad, porque aunque nos cueste hacer reencuentros, siempre he podido contar con ellos. En especial a Cris, que al estar también en Madrid nos hemos servido mutuamente para animarnos, echar unas risas y desahogarnos en muchas ocasiones. Gracias también a MJ por esas estupendas escapadas que tan necesarias son para poder seguir con el día a día. Y a mis amigos del instituto, que por muchos años que pasen, seguimos estando ahí los unos para los otros.

Pero no hubiese podido llegar hasta aquí si no fuera por el apoyo incondicional que siempre me han mostrado mis padres, Lola y Ramón. Ellos han hecho de mi la persona que soy hoy día y me han brindado la oportunidad de alcanzar mis metas. Gracias a su apoyo y consejos dirigí mis estudios hacia la rama científica y pude estudiar la Licenciatura en Biotecnología y el Máster en Biomedicina Molecular que me han permitido llegar hasta aquí. Tampoco hubiese llegado donde me encuentro hoy sin el apoyo de mi novio Javi, quien me ha seguido y apoyado en todas mis decisiones y siempre sabe cómo sacarme una sonrisa, hasta en los peores momentos. Nunca tendré palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí.

Muchas gracias a todos y cada uno de vosotros por vuestro apoyo tanto científico como moral a lo largo de estos años. Sin vosotros este trabajo no hubiese sido posible.

Gracias a todos.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayor causa de muerte y hospitalización a nivel mundial, sin embargo, el papel de las proteínas de unión a RNA (RBPs) en las mismas no se conoce lo suficiente. Nosotros hemos observado que tras un infarto de miocardio (MI), la expresión de SRSF3 se reduce, sugiriendo que podría desempeñar un papel en la enfermedad y/o la homeostasis cardíaca. La falta de expresión cardíaca de SRSF3 durante el desarrollo resulta letal para los embriones, indicando que SRSF3 es necesario para la correcta formación del corazón, sobre todo tras E11.5 cuando su expresión cardíaca se incrementa. Para determinar su papel en el corazón adulto desarrollamos un modelo de ratón knockout para SRSF3 cardio-específico e inducible con tamoxifeno. Tras la inyección de tamoxifeno, los ratones muestran una dramática reducción en la contractilidad del corazón, lo que da lugar a la muerte de los animales en ocho días. Estos ratones muestran un incremento en marcadores de disfunción cardíaca junto con una importante bajada de expresión de genes involucrados en la contracción cardíaca. También descubrimos que SRSF3 interactúa con LSM14A, el cual interviene en el proceso de decapping y degradación de los mRNAs. Curiosamente, existe un aumento del decapping de los mRNAs que reducen su expresión tras la pérdida de SRSF3. Estos resultados sugieren que SRSF3 previene el decapping de los mRNAs, probablemente mediante su interacción con LSM14A y que su eliminación induce la degradación de los genes implicados en la contracción debido al incremento del decapping. Utilizando un virus adeno-asociado de serotipo 9 que expresa SRSF3 (AAV9-SRSF3), observamos que tras un MI, los ratones sobrexpresantes de SRSF3 muestran un incremento de la fracción de eyección y una reducción del volumen diastólico del ventrículo izquierdo, sugiriendo que la bajada de expresión de SRSF3 tras el MI es parcialmente responsable del empeoramiento de la función cardíaca. Además, también hemos observado un incremento del decapping y una bajada de expresión de los genes implicados en la contracción en ratones C57BL/6 tras un MI.

SUMMARY

Cardiovascular diseases are a major cause of mortality and hospitalization worldwide, however the role of RNA binding proteins (RBPs) in heart disease is poorly understood. We have found that SRSF3 expression decreases after myocardial infarction (MI), suggesting that it may play a role in cardiac homeostasis and/or disease. We found that SRSF3 cardiac depletion during development is embryonic lethal, indicating that SRSF3 is necessary for heart development, especially after E11.5 when its expression is upregulated in the heart. To determine the role of SRSF3 in the adult heart we developed a cardiomyocyte-specific tamoxifen-inducible SRSF3 knockout mouse line. After tamoxifen injection, mice showed a dramatic reduction in heart contractility, resulting in death of the animal within eight days. Gene expression analysis showed increased expression of cardiac dysfunction markers, together with a downregulation of genes involved in cardiac contraction. We also found that SRSF3 interacts with LSM14A, which has been described to promote mRNA decapping and degradation. Interestingly, we observed increased decapping of those mRNAs downregulated after SRSF3 depletion. These results suggest that SRSF3 prevents mRNA decapping probably by interacting with LSM14A and that its depletion induces the degradation of contraction related genes due to decapping. Using an adeno-associated virus serotype 9 that overexpresses SRSF3 (AAV9-SRSF3), we observed that after MI, overexpression of SRSF3 resulted in an increase in left ventricular ejection fraction and a decrease in left ventricular diastolic volume, suggesting that the downregulation of SRSF3 after MI is partially responsible for the deterioration of cardiac function. Furthermore, we have also found increased decapping and downregulation of contraction related genes after MI in C57BL/6 mice.

ÍNDICE

CERTIFICADO DEL DIRECTOR	3
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	9
SUMMARY	11
ÍNDICE	13
ABREVIATURAS Y SIGLAS	17
INTRODUCCIÓN	19
<i>Enfermedades Cardiovasculares e Infarto de Miocardio Agudo</i>	<i>19</i>
<i>Proteínas de Unión a RNA</i>	<i>22</i>
<i>Proteínas SR</i>	<i>25</i>
<i>Implicación de las proteínas SR en enfermedades</i>	<i>30</i>
<i>SRSF3</i>	<i>32</i>
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	39
<i>Aislamiento del RNA y realización de qRT-PCR</i>	<i>39</i>
<i>Extracción de embriones e hibridación In situ</i>	<i>39</i>
<i>Inmunofluorescencia</i>	<i>39</i>
<i>Western Blot</i>	<i>40</i>
<i>Ratones</i>	<i>41</i>
<i>Tratamiento con tamoxifeno</i>	<i>42</i>
<i>Análisis ecocardiográfico</i>	<i>42</i>
<i>RNA-Seq</i>	<i>43</i>
<i>Construcciones de DNA</i>	<i>44</i>
<i>Producción de RNA modificado</i>	<i>45</i>
<i>Aislamiento y transfección de cardiomiocitos neonatales</i>	<i>45</i>

<i>Inmunoprecipitación de RNA (RIP)</i>	46
<i>Ensayo de estabilidad de RNA</i>	46
<i>Análisis proteómico y co-inmunoprecipitación</i>	47
<i>Análisis de decapping</i>	48
<i>Producción de virus adeno-asociados</i>	48
<i>Inyección de virus adeno-asociados por vena femoral</i>	48
<i>Cirugía de infarto de miocardio</i>	49
<i>Análisis estadístico</i>	49
RESULTADOS	53
Descripción de la expresión de SRSF3 en el corazón.....	53
<i>La expresión de SRSF3 disminuye con la edad</i>	53
<i>La expresión de SRSF3 disminuye tras el infarto de miocardio</i>	55
Caracterización de la función de SRSF3 en el corazón adulto.....	57
<i>La pérdida de SRSF3 en el corazón durante el desarrollo conlleva la muerte de los embriones</i>	57
<i>Los ratones SRSF3 KO cardio-específicos mueren de forma prematura y desarrollan problemas de contracción</i>	59
Caracterización del mecanismo molecular de acción de SRSF3 en el corazón adulto.....	62
<i>La pérdida de SRSF3 conlleva la bajada la expresión de genes relacionados con la contracción</i>	62
<i>La unión de SRSF3 a la zona 3' UTR no incrementa la estabilidad del mRNA</i> ..	67
<i>La pérdida de SRSF3 induce el proceso de NMD de forma tardía</i>	69
<i>SRSF3 interactúa con LSM14A e interfiere en el proceso de decapping</i>	69
<i>La sobreexpresión de SERCA2A rescata parcialmente el fenotipo de los ratones SRSF3 KO</i>	73
Caracterización de la sobreexpresión de SRSF3 en el infarto de miocardio.....	75
<i>La sobreexpresión de SRSF3 mejora la función cardíaca tras el infarto de miocardio</i>	75

<i>Tras el infarto de miocardio baja la expresión de genes de contracción y aumenta su decapping</i>	75
DISCUSIÓN	79
<i>La pérdida de SRSF3 en el corazón causa un fenotipo más agresivo en comparación con la de otras proteínas SR.....</i>	79
<i>Comparación del fenotipo cardíaco de SRSF3 con el de otros tejidos.....</i>	81
<i>SRSF3 interviene en la degradación de los mRNAs.....</i>	81
<i>La expresión de SRSF3 regula parcialmente la función cardíaca post-infarto .</i>	85
<i>Tras un infarto de miocardio aumenta el decapping de genes de contracción</i>	87
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	91
MATERIAL SUPLEMENTARIO: TABLAS.....	103
MATERIAL SUPLEMENTARIO: PUBLICACIONES.....	107

ABREVIATURAS Y SIGLAS

- **BNP:** Péptido natriurético B
- **CVDs:** Enfermedades cardiovasculares
- **GAPDH:** Deshidrogenasa glyceraldehido-3-fosfato
- **IP:** Inmunoprecipitación
- **KO:** Knockout
- **Luc:** Luciferasa
- **MI:** Infarto de miocardio
- **MYBPC3:** Poteína de unión a miosina C3
- **MYH:** cadena pesada de la miosina
- **NMD:** Non-sense mediated decay
- **PTC:** codón de terminación prematuro
- **RBP:** Proteína de unión a RNA
- **RIP:** Inmunoprecipitación de RNA
- **RRM:** motivo de reconocimiento de RNA
- **RyR2:** Receptor de rianodina 2
- **SERCA2A:** ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplasmático
- **SMG:** proteína kinasa de serina/treonina
- **SRSF:** Factor de splicing rico en serina-arginina
- **TNNT2:** Troponina T2
- **UTR:** Región no traducida
- **VI:** Ventrículo Izquierdo
- **Vinc:** Vinculina

INTRODUCCIÓN

Enfermedades Cardiovasculares e Infarto de Miocardio Agudo

Las enfermedades cardiovasculares (CVDs, por sus siglas en inglés) constituyen la principal causa de muerte en todo el mundo, anualmente muere más gente de CVDs que de cualquier otra enfermedad. Se estima que 17.7 millones de personas fallecieron en 2015 a causa de las CVDs, lo que representa el 31% de muertes a nivel mundial (WHO, 2017). De los 17 millones de muertes prematuras (menores de 70 años), el 37% se deben a CVDs (WHO, 2017). Solo en Europa, las CVDs causan 3.9 millones de muertes cada año, constituyendo el 45% de las muertes europeas (Wilkins *et al.*, 2017). A pesar de que la mortalidad asociada a CVDs ha disminuido, la incidencia de las mismas en los últimos 25 años se ha incrementado. Como consecuencia, también ha aumentado el gasto hospitalario para el tratamiento de estos pacientes. Sólo en 2015, 85 millones de europeos vivieron con CVDs. Se calcula que el gasto de la comunidad europea en CVD es de 210 billones de euros al año (Wilkins *et al.*, 2017). De todas las muertes causadas por CVDs a nivel mundial, se estima que 7.4 millones se deben a enfermedades coronarias y 6.7 millones a infarto de miocardio (MI, por sus siglas en inglés) (WHO, 2017). El infarto de miocardio constituye por tanto una de las principales causas muerte por CVD, motivo por el cual hemos centrado nuestro interés científico en modelos animales de infarto de miocardio.

El MI se produce tras la oclusión de una arteria coronaria. Como consecuencia, los cardiomiocitos irrigados por dicha arteria mueren progresivamente debido a la falta de oxígeno y nutrientes. Aunque la reperusión de la arteria ocluida reduce la extensión del infarto (y por consiguiente la mortalidad), la magnitud del daño y el área necrótica son en la mayoría de los casos todavía considerables. Los cardiomiocitos muertos son reemplazados por una cicatriz compuesta mayormente de matriz extracelular. Además de una ausencia de contractilidad del miocardio necrosado, el miocardio remoto (no infartado) sufre un

remodelado progresivo que deriva en la dilatación del corazón aumentando así el volumen del ventrículo. Todo ello provoca un deterioro progresivo de la función cardiaca post-infarto (Figura 1).

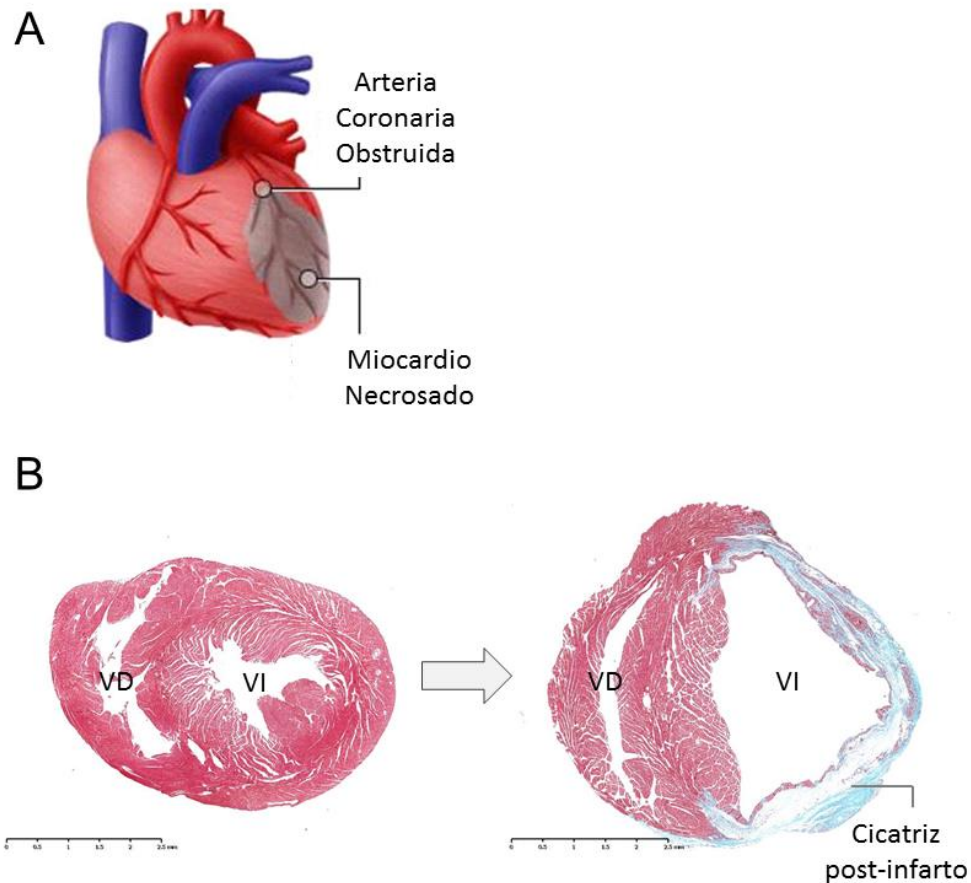


Figura 1. Infarto de miocardio. **A**, Tras la obstrucción de la arteria coronaria, el tejido de miocardio irrigado por la misma se necrosa debido a la falta de nutrientes y oxígeno. **B**, Los cardiomiocitos muertos son reemplazados por una cicatriz de matriz extracelular y el ventrículo izquierdo del corazón se dilata. Tinción de tricrómico de Masson de corazones extraídos de ratones C57BL/6 pre y 28 días post-infarto. VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo. Barra, 2.5 mm.

Este deterioro se debe en gran parte a un empeoramiento de la capacidad de contracción del corazón y por tanto una reducción de su capacidad para bombear sangre, produciéndose una bajada de la fracción de eyección, definida como la proporción de sangre expulsada del ventrículo en cada latido. La contracción de los cardiomiocitos y como consecuencia del corazón, está regulada por el flujo

intracelular de Ca^{2+} . Cuando llega el impulso eléctrico, la célula se despolariza y se produce la entrada de cationes de Ca^{2+} . Esto provoca una liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico a través del receptor de rianodina (RyR2). Este Ca^{2+} es captado por componentes del sarcómero provocando un acortamiento del mismo y la contracción celular. El sarcómero está formado por varios tipos de proteínas, entre ellos troponinas, miosinas y actina. Durante la relajación del cardiomiocito, el Ca^{2+} es liberado del sarcómero y devuelto al retículo sarcoplásmico a través de la ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplasmático (SERCA2A) (Figura 2). Tras un infarto de miocardio, la expresión de algunos de estos genes se ve reducida en los cardiomiocitos del miocardio remoto, lo que se traduce en un deterioro progresivo de la capacidad de contracción y de la función cardíaca (Sallinen *et al.*, 2007; Lipskaia *et al.*, 2010). Sin embargo, los mecanismos responsables de mediar esta bajada aún no se conocen por completo.

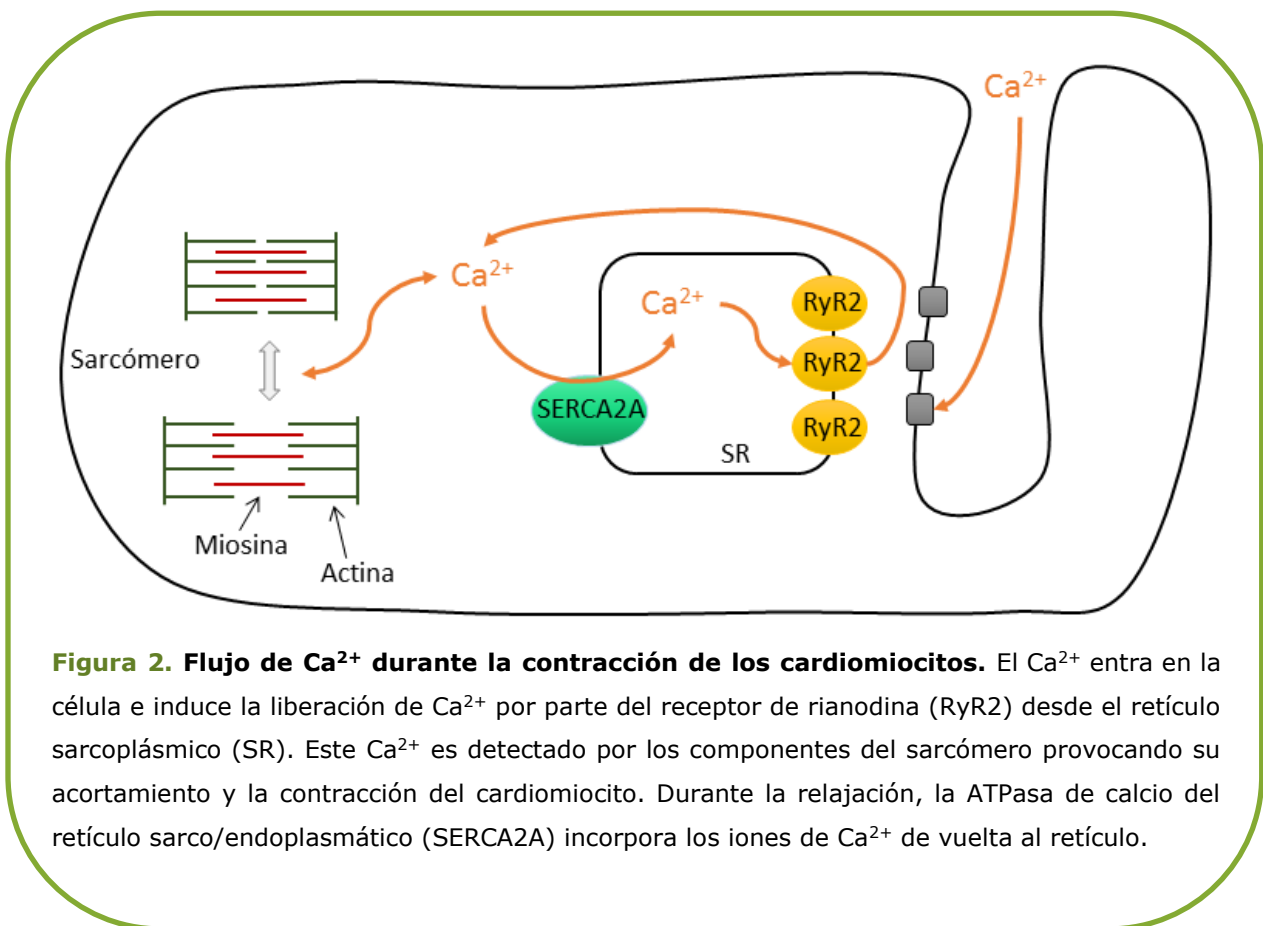


Figura 2. Flujo de Ca^{2+} durante la contracción de los cardiomiocitos. El Ca^{2+} entra en la célula e induce la liberación de Ca^{2+} por parte del receptor de rianodina (RyR2) desde el retículo sarcoplásmico (SR). Este Ca^{2+} es detectado por los componentes del sarcómero provocando su acortamiento y la contracción del cardiomiocito. Durante la relajación, la ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplasmático (SERCA2A) incorpora los iones de Ca^{2+} de vuelta al retículo.

A pesar de avances significativos en la práctica clínica, el pronóstico tras MI continúa siendo muy pobre y el tratamiento sigue siendo fundamentalmente paliativo. La falta de conocimiento sobre los mecanismos moleculares que acompañan al desarrollo de este empeoramiento post-infarto impide el desarrollo de terapias más eficaces. Durante los últimos años hemos incrementado nuestro conocimiento de los patrones de expresión génica durante el desarrollo de las enfermedades cardíacas y de su regulación por rutas de señalización intracelular y factores de transcripción (Heineke and Molkentin, 2006; Thum *et al.*, 2007; Barth *et al.*, 2011). Sin embargo, existe otro nivel de regulación y señalización que por desgracia aún no se ha explorado tanto en el corazón. La regulación post-transcripcional y el papel de las proteínas de unión a RNA (RBPs) en las CVDs continúa siendo un campo por descubrir.

Proteínas de Unión a RNA

Las proteínas de unión a RNA (RBPs, por sus siglas en inglés) se caracterizan por contener dominios de unión a RNA y regular muchos procesos dentro del metabolismo de los RNAs a través de su unión a los mismos. Esta unión se puede producir mediante el reconocimiento de una secuencia específica de nucleótidos y/o de motivos estructurales presentes en el RNA (Hentze *et al.*, 2018). Los humanos expresamos más de 1.500 RBPs, cada una de ellas interactuando con distintas afinidades a distintos RNAs (Gerstberger, Hafner and Tuschl, 2014). Las RBPs pueden intervenir en cada aspecto de la regulación de los RNAs, incluyendo el splicing tanto constitutivo como alternativo, el transporte, la localización, la traducción y la degradación (Castello *et al.*, 2013; Corbett, 2018). Inicialmente, los RNAs se consideraron simples moldes (mRNA) o moléculas estructurales (tRNA o rRNA) necesarias para la producción de proteínas. Sin embargo, el descubrimiento de RNAs catalíticos y RNAs no codificantes ha abierto las puertas a un nuevo mundo de regulación molecular. En los últimos años se ha descubierto que los RNAs llevan a cabo muchas funciones reguladoras en la célula. De ahí la importancia de la caracterización de las proteínas de unión a RNA y su impacto en la función de los mismos (Gerstberger, Hafner and Tuschl, 2014).

Debido a la gran red de interacciones que coordinan las RBPs dentro del metabolismo del RNA, la falta de actividad de estas proteínas puede afectar a multitud de procesos y genes dando lugar a complejos y variados fenotipos (Corbett, 2018). Un reflejo de su importancia es que la pérdida de función de algunas RBPs ha sido asociada a manifestaciones clínicas, incluyendo neuropatías, atrofas musculares y cáncer (Pereira, Billaud and Almeida, 2017; Corbett, 2018). Un ejemplo de enfermedad neurológica causada por pérdida de función de una RBP es el síndrome X frágil. Este síndrome está causado por una expansión de más de 200 repeticiones del triplete CGG localizada en la región 5' del gen FMR1. En individuos no afectados, el número de repeticiones CGG es variable y se mantiene entre 6 y 54. La hipermetilación de las islas CpG provoca el silenciamiento de dicho gen dando lugar a una reducción de la expresión de la proteína FMRP. Los pacientes que sufren esta enfermedad muestran deficiencias en el desarrollo mental y anomalías craneofaciales (Garber, Visootsak and Warren, 2008; Lukong *et al.*, 2008; Castello *et al.*, 2013; Corbett, 2018). El mecanismo de acción de la proteína FMRP consiste en reprimir la traducción de sus dianas. FMRP media la represión de la traducción dependiente de miRNA a través de su interacción con los componentes del complejo de inducción del silenciamiento de los RNA (RISC) (Jin, Alisch and Warren, 2004). Por otro lado, muchos estudios han demostrado que existe una expresión anormal de RBPs en tejidos cancerígenos con respecto a tejidos normales y que esta expresión correlaciona con la prognosis del paciente (Pereira, Billaud and Almeida, 2017). Por ejemplo, la proteína de unión a RNA Sam68 se encuentra inducida en pacientes con cáncer de próstata, promoviendo la proliferación celular (Busà *et al.*, 2007). Su mecanismo de acción se basa en alterar el splicing alternativo del mRNA de CCND1, promoviendo la expresión de la isoforma D1b en carcinomas de próstata humanos (Paronetto *et al.*, 2010). La inducción de la expresión de LIN28B también ha sido asociada con un aumento en la patogénesis y la metástasis en cáncer de colon, pudiendo estar implicado en la represión de la biogénesis del miRNA let-7 (King *et al.*, 2011).

Aunque la implicación de las RBPs en la función cardiaca y enfermedades cardiovasculares no es un campo tan explorado como las neuropatías o el cáncer, existen estudios recientes que resaltan la importancia de estas proteínas para la

correcta función del corazón. Una de las más caracterizadas es RBM20. RBM20 se expresa de forma abundante en el corazón humano y se han descrito polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) que alteran la expresión de la proteína y están asociados a un incremento en el riesgo de sufrir cardiomiopatía dilatada (DCM) (Li *et al.*, 2010; De Bruin *et al.*, 2017). La alteración en la expresión de RBM20 provoca cambios en el splicing de genes involucrados en la contracción cardíaca, incluyendo la titina (TTN), pudiendo ser la causa del desarrollo de DCM (Guo *et al.*, 2012). Otro ejemplo de RBP cuya expresión en cardiomiocitos es esencial para la correcta función cardíaca es TRBP. La depleción cardíaca de TRBP provoca la aparición de una cardiomiopatía progresiva e insuficiencia cardíaca que resulta letal para los ratones. En dicho estudio se identifica el miRNA miR-208a como diana de TRBP, el cual es necesario para la inhibición de la expresión de Sox6 y el consecuente mantenimiento del equilibrio de expresión entre los genes de las miofibras de contracción rápidas y lentas, esencial para la correcta función del corazón (Ding *et al.*, 2015). La correcta función de la familia de proteínas de unión a RNA RBFOX corrobora el importante papel de las RBPs en el buen funcionamiento del corazón. C.Wei *et al.* observaron que tras inducir constricción de la aorta (TAC) en ratones, la expresión cardíaca de RBFOX2 se reduce drásticamente. Tanto después de TAC como en un modelo de ratón knockout cardio-específico para RBFOX2, se producen fenotipos relacionados con enfermedad cardíaca y en ambos casos se producen eventos de splicing alternativo claves para el correcto funcionamiento del corazón, sugiriendo que RBFOX2 es un componente esencial de la descompensación cardíaca (Wei *et al.*, 2015). De forma similar, la expresión de RBFOX1 también se ve disminuida en corazones enfermos tanto de ratón como de pacientes humanos. En este estudio demuestran la implicación de RBFOX1 en el evento de splicing del exón α de los miembros de la familia de factores de transcripción MEF2, el cual tiene un papel crítico en el desarrollo de hipertrofia e insuficiencia cardíaca. Además, han observado que la sobreexpresión de RBFOX1 produce una reducción del remodelamiento patológico tras TAC, reduciendo la hipertrofia cardíaca y la expresión de colágeno (Gao *et al.*, 2016).

Proteínas SR

Dentro de las RBPs, existe una familia proteica muy conservada formada por las denominadas proteínas SR. El grupo de proteínas SR “clásicas” lo componen 7 proteínas descubiertas por su reactividad con el anticuerpo mAb104 (Roth, Murphy and Gall, 1990). Este anticuerpo reconoce un epítipo común en la región C-terminal de las proteínas SR que es rico en serina (S) y arginina (R), a la cual se le debe el nombre de esta familia proteica. Cada una de estas proteínas se nombró inicialmente de acuerdo a su peso molecular: SRp20, SRp30, SRp40, SRp55 y SRp75. En 2010, las proteínas SR se renombraron de forma sistemática como SRSF (SR Splicing Factor) y se definieron como aquellas proteínas que contienen uno o dos motivos de reconocimiento de RNA (RRM), seguidos de un dominio SR de al menos 50 aminoácidos con un contenido superior al 40% de serinas y argininas, caracterizado por dipéptidos SR o RS consecutivos (Manley and Krainer, 2010; Änkö, 2014). De esta forma, los miembros de la familia SR aumentaron a un total de 12 proteínas (SRSF1-12) (Figura 3). El dominio RRM es el responsable de la unión al RNA y determina la especificidad de unión de las proteínas SR, mientras que el dominio SR está implicado principalmente en las interacciones proteína-proteína y contiene la señal de localización nuclear. Los aminoácidos de serina del dominio SR están sometidos a fosforilaciones que influyen en la función de la proteína SR (Änkö, 2014). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las funciones de estos dominios pueden no estar tan restringidas, de forma que el dominio SR podría interactuar con el RNA y el dominio RRM podría intervenir en las interacciones proteína-proteína (Shen, Kan and Green, 2004; Cho *et al.*, 2011). Cabe destacar la presencia de un dominio de dedo de zinc (ZnF) en una de las proteínas SR, SRSF7, que potencialmente contribuye a la unión al RNA (Figura 3).

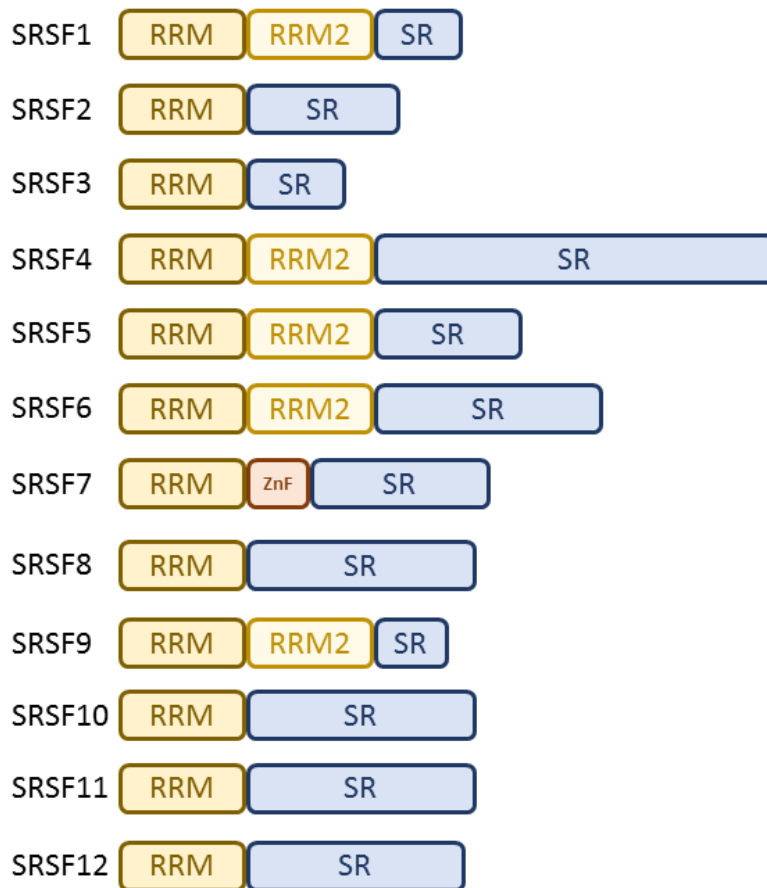
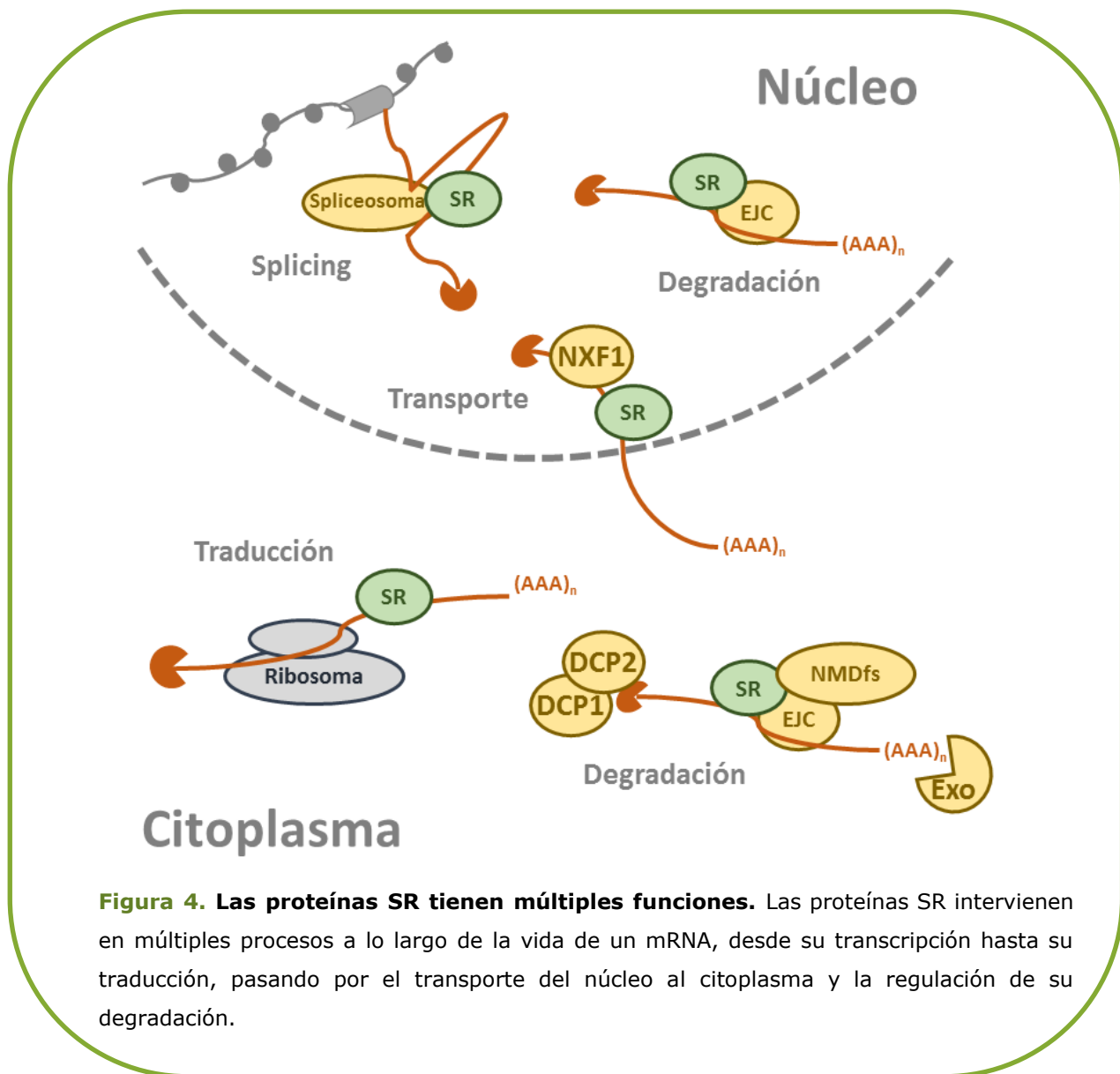


Figura 3. Familia de proteínas SR. Las proteínas SR contienen uno o dos motivos de unión a RNA (RRM) en su extremo N-terminal seguidos de un dominio SR de más de 50 aminoácidos con un contenido en SR mayor al 40%.

Inicialmente, las proteínas SR fueron descritas como factores de splicing, siendo esenciales para la formación del spliceosoma y la eliminación de los intrones para generar los mRNAs que finalmente serán traducidos a proteínas. Su función es la de determinar los sitios de corte en el mRNA, influyendo así tanto en el splicing constitutivo como en el alternativo. Sin embargo, casi desde su descubrimiento, se determinó que su función no estaba restringida al splicing, ya que no solo se unen a RNAs que contienen intrones (Änkö, 2014). Varios estudios han demostrado que las proteínas SR están implicadas en la regulación de muchos pasos del procesamiento de los RNAs y de la expresión génica (Zhong *et al.*, 2009). Por tanto, queda claro que las proteínas SR no son simples factores de splicing, sino proteínas multifuncionales que intervienen en diversas vías de regulación génica desde la transcripción hasta la traducción (Figura 4).



Las proteínas SR son más abundantes en el núcleo, en concordancia con su función como factores de splicing. Sin embargo, se ha descrito que la expresión de las proteínas SR no se restringe al núcleo celular y que algunos miembros de esta familia pueden transportarse entre el núcleo y el citoplasma (Cáceres, Sreaton and Krainer, 1998; Sapra *et al.*, 2009). Posteriormente se ha demostrado que este transporte es imprescindible para poder trasladar los mRNAs al citoplasma. Al reducir la expresión de determinadas proteínas SR, más de 1000 mRNAs se vieron acumulados en el núcleo. En concreto, encontraron que SRSF3 y SRSF7 promueven

la unión al mRNA del factor NXF1, conocido por ser esencial para exportar mRNAs al citoplasma (Müller-McNicoll *et al.*, 2016).

La fosforilación del dominio SR representa un mecanismo importante de regulación tanto de la localización como de la actividad de estas proteínas. Al terminar el proceso de splicing, las proteínas SR se defosforilan, siendo este estado crucial para su implicación en el proceso de transporte al citoplasma. Para el retorno de las proteínas al núcleo, las proteínas SR necesitan ser fosforiladas de nuevo (Zhou and Fu, 2013). Por tanto, la regulación de la fosforilación de las proteínas SR puede constituir un importante mecanismo de integración de señales celulares para coordinar el procesamiento y transporte de los RNAs.

Las proteínas SR también están implicadas en la estabilidad de los RNAs. Tras su producción, los mRNAs se someten a un proceso de control, de forma que los mRNAs aberrantes se degradan para evitar su traducción en proteínas truncadas. Uno de estos controles es el proceso de non-sense mediated decay (NMD). Esta vía detecta aquellos RNAs en los que hay un codón de terminación prematuro (PTC), normalmente causado por un evento de splicing alternativo, y los degrada. Se determina si un codón de terminación es un PTC en función de la presencia de un complejo de unión exón-exón (EJC) después del codón (Lejeune and Maquat, 2005). Corroborando el papel de las proteínas SR en este proceso, se ha descrito la interacción de las mismas con el EJC (Singh *et al.*, 2012). Curiosamente, las proteínas SR contienen un exón alternativo cuya inclusión conlleva la aparición de un PTC y la consecuente degradación de su mRNA por NMD. Este mecanismo se utiliza para regular los niveles de expresión de estas proteínas (Jumaa and Nielsen, 1997; Sureau *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2010; Änkö *et al.*, 2012).

Las proteínas SR también pueden regular la estabilidad de los RNAs de forma independiente al proceso de NMD. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por R. Lemaire *et al.*, donde se demostró que SRSF1 influye en la estabilidad del mRNA PKCI-r, aumentando su tiempo de vida media ante la ausencia de la proteína SR, sin verse afectado su splicing o transcripción (Lemaire *et al.*, 2002). Esto sugiere

que las proteínas SR pueden estar implicadas potencialmente en los procesos de degradación de RNA independientes de NMD. Entre las rutas a través de las cuales se pueden degradar los mRNAs caben destacar dos: vía de degradación 5'-3' y la vía de degradación 3'-5'. En la primera, tras la pérdida de la cadena de polyA, se procede a la eliminación de la estructura cap que protege el extremo 5' del RNA mediante la acción el complejo DCP1-DCP2 y se continúa con la degradación del RNA desde dicho extremo por la acción de XRN1. Por otro lado, en la vía 3'-5', tras la eliminación de la cola de polyA se continúa la degradación del RNA por su extremo 3' mediante la acción del exosoma y finalmente la enzima DCPS elimina el cap (Figura 5) (Houseley and Tollervey, 2009; Li and Kiledjian, 2010).

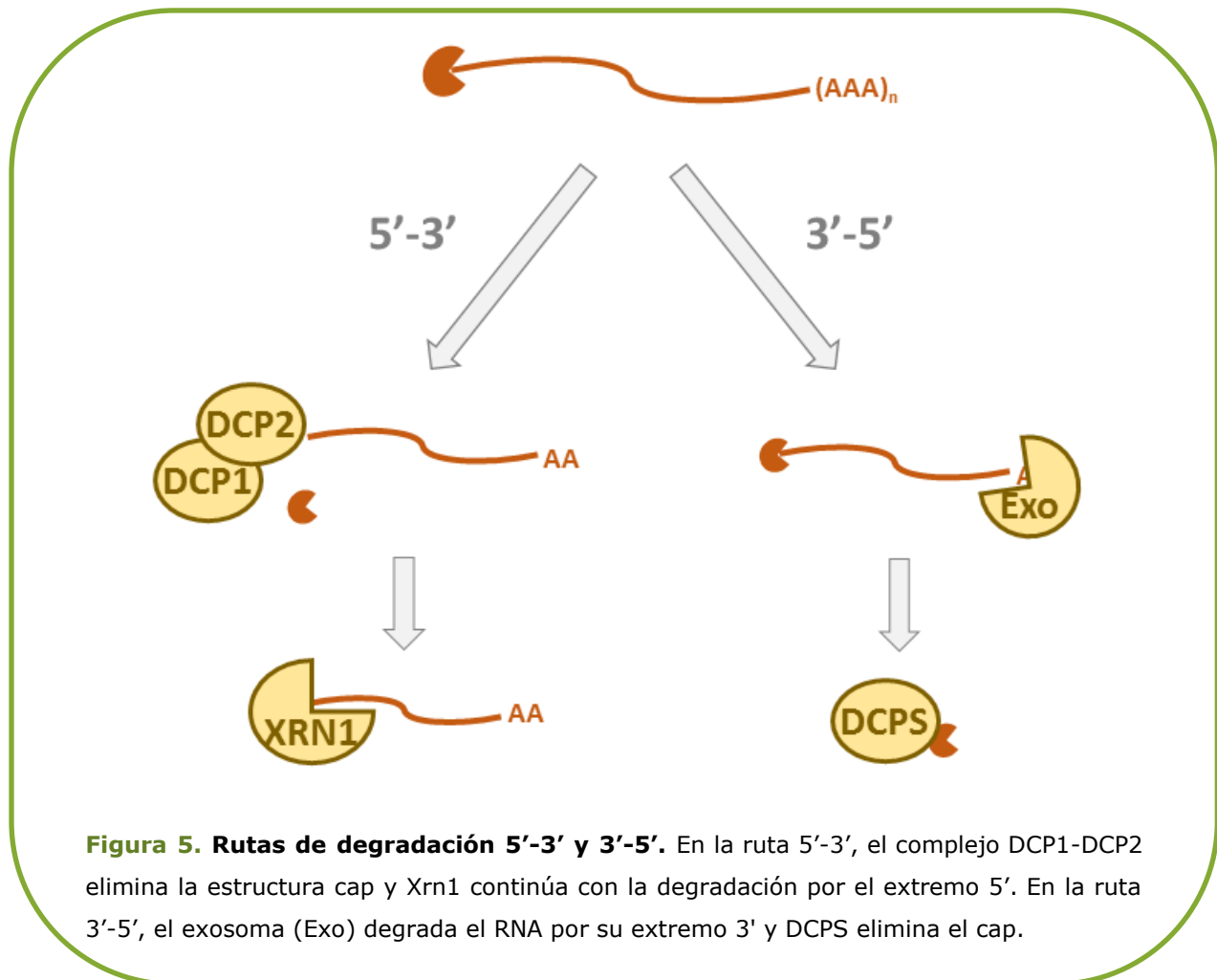


Figura 5. Rutas de degradación 5'-3' y 3'-5'. En la ruta 5'-3', el complejo DCP1-DCP2 elimina la estructura cap y Xrn1 continúa con la degradación por el extremo 5'. En la ruta 3'-5', el exosoma (Exo) degrada el RNA por su extremo 3' y DCPS elimina el cap.

Implicación de las proteínas SR en enfermedades

Dada la amplitud de las funciones que abarcan las proteínas SR es esperable que alteraciones de su expresión den lugar a fenotipos relacionados con enfermedades. Aunque es un campo en el que aún queda mucho por descubrir, existen algunos estudios que demuestran la importancia de los componentes de esta familia proteica en diversas patologías. El papel de las proteínas SR en cáncer es de los más estudiados. Solo en el cáncer de mama, seis proteínas SR se encuentran sobreexpresadas (SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF5, SRSF6 y SRSF10) (Silipo, Gautrey and Tyson-Capper, 2015). SRSF1 es de los miembros más estudiados de la familia SR y diversos estudios han asociado eventos de splicing causados por este factor con varios tipos de carcinomas. En cáncer de mama promueve la formación de las isoformas RPS6KB1, Mnk2b, c-Myb, todas ellas asociadas con mala prognosis de los pacientes (Karni *et al.*, 2007). También promueve la formación de la isoforma D1b, asociada con diferentes cánceres (Olshavsky *et al.*, 2010), o la isoforma oncogénica de Ron (Ghigna *et al.*, 2005), entre otros. SRSF2 promueve la inclusión de un exón alternativo, reduciendo los niveles de expresión de KLF6, conocido por evitar la progresión de tumores (Shi *et al.*, 2008). SRSF2 ha sido asociado también con el síndrome mielodisplásico. Mutaciones en el gen de SRSF2 están asociadas con características clínicas y biológicas de la enfermedad y podrían desempeñar un papel en su progresión (Wu *et al.*, 2014). SRSF5, SRSF6 y SRSF10 promueven la inclusión de exones alternativos en CD44. Cada proteína SR mencionada regula la inclusión de determinados exones, pero en todos los casos el resultado es una isoforma que promueve la metástasis y la invasión celular (Pind and Watson, 2003; Watermann *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007).

Pero el cáncer no es la única enfermedad en la que se ha descrito la implicación de las proteínas SR. SRSF1 y SRSF6 están implicados en el splicing del gen LMNA de forma opuesta, afectando como consecuencia al fenotipo del síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS). La depleción de SRSF1 revierte el fenotipo de núcleos dismórficos observado en fibroblastos embrionarios obtenidos de ratones con fenotipo HGPS, mientras que la depleción de SRSF6 agrava dicho

fenotipo (Lopez-Mejia *et al.*, 2011). El desarrollo de la atrofia de músculo espinal también se encuentra influido por la proteína SRSF1. Esta enfermedad está causada por una falta de función del gen SMN1. Dicha función podría ser sustituida por el gen casi idéntico SMN2, cuya expresión de la proteína completa depende de la inclusión del exón 7 que está mediada por SRSF1 (Cartegni and Krainer, 2002). Por otro lado, el splicing mediado por SRSF6 influye en el desarrollo de enfermedades neuronales. En este caso, SRSF6 regula el splicing de TAU, cuyo ratio de isoformas es crucial para el desarrollo de tauopatías (Yu, Guo and Zhou, 2004). La obesidad es otra enfermedad cuyo desarrollo está influenciado por eventos de splicing mediados por proteínas SR, en concreto SRSF10. J. Pihlajamäki *et al.* demostraron que la reducción de expresión de SRSF10 observada en obesidad altera el splicing de LPIN1, dando lugar a una desregulación de las vías lipogénicas que contribuye a la hiperglicemia (Pihlajamäki *et al.*, 2011).

En el ámbito del corazón, se ha demostrado que algunas de las proteínas SR son esenciales para su buen funcionamiento y/o formación. La primera proteína SR estudiada en corazón fue SRSF2. Mediante la generación de un ratón knockout cardio-específico para SRSF2 se demostró que esta proteína SR no es esencial para la formación embrionaria del corazón ni para la esperanza de vida de los ratones. Sin embargo, entre 3 y 5 semanas después del parto, los ratones comienzan a desarrollar una cardiomiopatía dilata no letal, en la que se observa una bajada de expresión del receptor de rianodina (RyR2), proteína encargada de la liberación del calcio desde el retículo endoplásmico durante la contracción cardíaca (Ding *et al.*, 2004). La depleción cardio-específica de SRSF1 tampoco es indispensable para la correcta formación cardíaca, aunque en este caso, los ratones mueren entre 6 y 8 semanas tras el parto. Esto se debe a un defecto en el splicing postnatal de la kinasa IIδ dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKIIδ) que resulta en un fenotipo letal de hipercontracción de los cardiomiocitos (Xu *et al.*, 2005). Por otro lado, la pérdida constitutiva y ubicua de SRSF10 da lugar a la aparición de severos problemas en la formación del corazón que provoca que la mayoría de embriones no sobrevivan más allá de E15.5. Este fenotipo se debe a un defecto en el pre-procesamiento de la triadina mediado por SRSF10, el cual reduce sus niveles de expresión y afecta a la liberación del Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico durante el

proceso de contracción (Feng *et al.*, 2009). Estos estudios demuestran el importante papel de las proteínas SR tanto en el desarrollo embrionario como en el correcto funcionamiento del corazón y el desarrollo de cardiomiopatías.

SRSF3

SRSF3 es el miembro más pequeño de la familia de proteínas SR. Está compuesto por un motivo de unión a RNA en su extremo N-terminal seguido del dominio SR compuesto por 79 aa, que constituyen aproximadamente la mitad de la proteína (Corbo, Orrù and Salvatore, 2013). Esta proteína no supone una excepción dentro de su familia proteica y lleva cabo multitud de funciones celulares que regulan el metabolismo de los RNAs y que influyen en la aparición y desarrollo de enfermedades. Respecto a la función más conocida para las proteínas SR, varios estudios han descrito la implicación de SRSF3 en el splicing de diferentes genes. El ratio de inclusión/exclusión del exón 10 del gen TAU determina la función de dicha proteína en el cerebro adulto y puede desencadenar tauopatías, incluyendo demencia y Parkinson. SRSF3, junto con SRSF6, participa en el splicing alternativo de TAU, promoviendo la exclusión del exón 10 (Yu, Guo and Zhou, 2004). La función de SRSF3 en enfermedades neuronales se extiende también a la enfermedad de Alzheimer, mediante la regulación del splicing de TRKB. SRSF3 promueve la generación de la isoforma Trkb-Shc que está involucrada en el desarrollo de esta enfermedad (Wong *et al.*, 2012). Otras dianas cuyo splicing se encuentra regulado por SRSF3 incluyen la fibronectina (de la Mata and Kornblihtt, 2006), el receptor de insulina (Sen, Talukdar and Webster, 2009) o Rac1 (Gonçalves, Matos and Jordan, 2009).

Al igual que las otras proteínas SR, el papel de SRSF3 y su mecanismo en cáncer ha sido muy estudiado. SRSF3 ha sido descrito como un proto-oncogen, dado que su expresión se ve incrementada en células tumorales. Se ha demostrado que SRSF3 es esencial para la proliferación celular, ya que promueve la transición G2/M. Como consecuencia, esta proteína es fundamental para el inicio, progresión y mantenimiento del tumor (Jia *et al.*, 2010; He *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2017,

2018). Aunque todos los estudios coinciden en que SRSF3 promueve la proliferación tumoral, su mecanismo de acción parece no ser el mismo en todos los casos. Por un lado se ha demostrado que SRSF3 regula el splicing de p53, de forma que cuando baja la expresión de SRSF3 hay un enriquecimiento de la isoforma p53 β que promueve la senescencia celular (Tang *et al.*, 2013). Por otro lado, un estudio llevado a cabo con células de cáncer de colon propone un mecanismo independiente de p53. En este caso, asocian el arresto del ciclo celular causado por una bajada de expresión de SRSF3 a un cambio en el splicing alternativo de HIPK2. Este cambio provoca la reducción de la expresión de la proteína completa de HIPK2 que da lugar a la apoptosis celular (Kurokawa *et al.*, 2014).

Otras dianas de la función de splicing de SRSF3 son las propias proteínas SR. Para muchas proteínas SR se ha descrito un mecanismo de regulación de expresión a través de splicing alternativo de sus propios mRNAs. M. Änkö *et al.* describieron como SRSF3 influye en el splicing de SRSF2, SRSF5 y SRSF7, promoviendo la inclusión de un exón alternativo que provoca la aparición de un PTC y conlleva la degradación del mRNA por NMD y la consecuente reducción de la expresión (Änkö *et al.*, 2012). Curiosamente, además de estas proteínas SR, SRSF3 también regula su propio splicing alternativo para mantener sus niveles de expresión. El estudio llevado a cabo por H. Jumaa y P.J. Nielsen constituye la primera evidencia de actividad auto-reguladora de una proteína SR. En él demostraron que la sobreexpresión de SRSF3 aumenta la proporción de transcritos que contienen el exón 4 alternativo. Al igual que ocurre con otras proteínas SR, la inclusión de este exón interrumpe la traducción de la proteína mediante la inserción de un PTC (Jumaa and Nielsen, 1997). Esta isoforma debe ser eliminada por NMD, sin embargo, se ha descrito que en condiciones de falta de suero, las células pueden expresar la proteína truncada de SRSF3 que carece de parte del dominio SR (Jumaa, Guenet and Nielsen, 1997). El hecho de forzar la expresión de esta proteína truncada en células provoca un aumento de la proliferación gracias a un incremento en la expresión de genes involucrados en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular (Kano *et al.*, 2013). Esta isoforma también tiene efecto sobre la inflamación que acompaña al cáncer de colon. Usando células tumorales de este tipo de cáncer, se observó que al incrementar la proporción de proteína truncada de

SRSF3, incrementa la producción de interleukina 8 (Kano *et al.*, 2014). Además, la bajada de expresión de SRSF3 en una línea celular de monocitos provoca el aumento en la producción de interleukina 1 β (Moura-Alves *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que SRSF3 podría participar en la regulación de la respuesta inflamatoria, aunque el mecanismo de acción no está claro en ninguno de los dos casos.

Como era de esperar, al igual que ocurre con otras proteínas SR, los mecanismos de acción moleculares de SRSF3 no se restringen al splicing. En 2001 ya se demostró que SRSF3 interviene en el transporte de los mRNA desde el núcleo hasta el citoplasma, tanto en oocitos de *Xenopus* como en células mamarias (Huang and Steitz, 2001). Posteriormente se describió que SRSF3 promueve dicho transporte gracias al reclutamiento del factor de transporte NXF1 al mRNA, siendo la proteína SR más importante para dicho reclutamiento y la que más mRNAs distintos transporta a través de la membrana nuclear (Müller-McNicoll *et al.*, 2016). Cabe destacar la unión de SRSF3 a la zona 3' UTR de los mRNAs, importante para su función de transporte y que podría influir también en la estabilidad del RNA (Müller-McNicoll *et al.*, 2016).

Dado que SRSF3 es capaz de transportarse entre el núcleo y el citoplasma, no es de extrañar que también desempeñe funciones fuera del núcleo, como, por ejemplo, en la traducción. En concreto, ha sido descrito que SRSF3 inhibe la traducción del mRNA de PDCD4 a través de su unión a la región 5' UTR y su reclutamiento en los P-bodies, lo cual puede conllevar una represión de la apoptosis, contribuyendo así al potencial oncogénico de SRSF3 (Kim *et al.*, 2014). La unión a esta región también podría implicar a SRSF3 en otras funciones de regulación de los mRNA, por ejemplo, en los procesos de degradación.

Pero las interacciones de SRSF3 no se restringen solo al RNA, ya que también es capaz de interactuar con otras proteínas. Una de estas interacciones ocurre con el complejo de unión de exones (EJC). G. Singh *et al.* demostraron que esta interacción solo ocurre cuando SRSF3 se encuentra en un estado hipofosforilado y postulan que el EJC podría influir en el reclutamiento y/o estabilización de la unión

de SRSF3 al mRNA (Singh *et al.*, 2012). Esto corrobora además el papel de SRSF3 en el proceso de NMD, dada la importante implicación que tiene el EJC en la determinación de los RNAs que deben ser degradados a través de este proceso (Lejeune and Maquat, 2005).

El primer modelo animal de depleción in vivo de SRSF3 lo desarrolló H. Jumaa *et al.* en 1999. En ese estudio demostraron que SRSF3 es esencial para el desarrollo de los embriones. Los ratones deficientes en la expresión de SRSF3 no son capaces de formar blastocistos y mueren en estadio de mórula (Jumaa, Wei and Nielsen, 1999). Posteriormente se desarrolló un modelo knockout de SRSF3 específico de hepatocitos (SRSF3HKO). En este caso la falta de expresión de SRSF3 no es letal, aunque los ratones presentan retraso en el crecimiento tanto embrionario como post-natal. El análisis de expresión génica demostró que el fenotipo se debe a una falta de maduración de las células hepáticas, las cuales tienen un patrón de expresión embrionario. Como consecuencia se ve afectada la producción hepática de glucosa y los ratones muestran un incremento en la tolerancia a la insulina. Los ratones SRSF3HKO tienen afectadas al menos 3 rutas hepáticas: SRSF3-HNF1 α -GH-IGF1, esencial para el desarrollo embrionario y post-natal; SRSF3-IRE1 α -XBP1 que regula la lipogénesis hepática; y SRSF3-SCAP-SREBP2, que controla la síntesis hepática de colesterol (Sen, Jumaa and Webster, 2013). Curiosamente, cuando estos ratones envejecen, desarrollan carcinomas hepáticos con características muy similares a la enfermedad humana. A diferencia de otros tipos de cáncer, la expresión de SRSF3 en carcinomas hepáticos humanos se ve reducida, por lo que la función de SRSF3 en el hígado podría ser supresora de tumores. De esta forma, su falta de expresión predispone, aunque no causa, la aparición de cáncer de hígado (Sen *et al.*, 2015).

Estos estudios muestran la relevancia de SRSF3 para el correcto desarrollo y función de los órganos del ratón. Sin embargo, a diferencia de otras proteínas SR, su función en el corazón aún no ha sido estudiada. Dado el importante papel de las RBPs en general y de las proteínas SR en particular en las enfermedades y desarrollo cardiacos, en esta tesis nos planteamos estudiar la función y mecanismo de acción de SRSF3 en el corazón.

OBJETIVOS

1. Estudiar la distribución de SRSF3 en el corazón desde el desarrollo embrionario hasta el corazón adulto sano y en el corazón infartado.
2. Identificar el papel de SRSF3 en la homeostasis del corazón adulto.
3. Describir el mecanismo molecular de acción de SRSF3 en la homeostasis del corazón adulto.
4. Determinar el papel de SRSF3 en la respuesta al infarto de miocardio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del RNA y realización de qRT-PCR

Se aisló el RNA de tejidos o células usando el reactivo TRIzol (15596026, Thermo Fisher Scientific). Para la síntesis de cDNA se han utilizado 100 ng de RNA total por muestra con el kit de Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription (4368814, Thermo Fisher Scientific). Para la PCR cuantitativa (qRT-PCR) se utilizó SYBR Green (4367659, Thermo Fisher Scientific) y el cDNA se amplificó con los primers indicados la Tabla 1. Los resultados se analizaron con el programa LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009). Los valores se normalizaron con GAPDH, los exones 4-5 de SRSF3, el total de expresión del correspondiente mRNA o F-Luc, según se indica en cada experimento.

Extracción de embriones e hibridación In situ

Los embriones se extrajeron a estadio E9.5, E10.5, E11.5, E12.5, E13.5 y E14.5 de ratones C57BL/6. Las hembras gestantes se sacrificaron llenando gradualmente la cámara con dióxido de carbono. Los embriones fueron procesados y en el caso de E12.5 en adelante se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 10 µm de grosor. La hibridación in situ se realizó en embrión completo (E9.5-E11.5) o en secciones (E12.5-E14.5) según el protocolo previamente descrito (Nus *et al.*, 2016). La sonda se diseñó contra la totalidad del cDNA de SRSF3.

Inmunofluorescencia

Los corazones fueron extraídos y fijados en 4% PFA (Paraformaldehído)/PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄-2H₂O, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄) durante 48 horas, lavados en etanol 70%, deshidratados e incluidos en parafina. Se cortaron en secciones de 5 µm. Para la inmunofluorescencia, los cortes fueron

desparafinados, desenmascarados con citrato, permeabilizados con 0.3% Tritón X-100/PBS y bloqueados primero con avidina-biotina (SP-2001, Vector Laboratories) y posteriormente con solución de bloqueo que contenía 3% BSA (albúmina de suero bovino), 0.3% Tween20, 2% $MgCl_2$ y 5% de suero de cabra diluido en PBS. Los cortes se incubaron durante la noche a 4°C con anti-SRSF3 (ab73891, Abcam) y anti-TroponinaT (MS295P, Fisher Scientific). Al día siguiente, tras lavar con PBS, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con los correspondientes secundarios: anti-rabbit biotinilado (111-066-003, Jackson Immuno Research) y anti-mouse Alexa 488 (A-11029, Thermo Fisher Scientific). Posteriormente se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con estreptavidina Cy3 (016-160-084, Jackson Immuno Research) y DAPI (D1306, Thermo Fisher Scientific). Finalmente se añadió medio de montaje Vectashield (H-1000, Vector Laboratories).

Western Blot

Los corazones de ratón se homogeneizaron en buffer de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS y 50 mM Tris pH 8.0) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa (04693159001 y 04906845001, Roche Diagnostics). Los lisados fueron separados en geles SDS-PAGE y transferidos a membranas PVDF (polifluoruro de vinilideno). El bloqueo se realizó con solución de leche en polvo desnatada al 3% en PBS. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C y al día siguiente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con HRP (anti-mouse P0447 y anti-rabbit P0448, Dako) durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron utilizando el reactivo ECL (RPN2106, GE Healthcare Life Sciences). El brillo y contraste de las membranas ha sido ajustado linealmente utilizando PowerPoint.

Los anticuerpos primarios utilizados han sido: anti-SRSF3 (ab73891, Abcam), anti-SRSF1 (PA5-30220, Thermo Fisher Scientific), anti-vinculina (V4505, Sigma), anti-GAPDH (ab8245, Abcam), anti-SERCA2A (ab2861, Abcam) y anti-MYH (ab90567, Abcam).

Ratones

Los ratones SRSF3 KO se obtuvieron a partir de los ratones previamente generados por el laboratorio de Peter J. Nielsen (Jumaa, Wei and Nielsen, 1999). Dichos ratones contienen un cassette de neomicina flanqueado por sitios LoxP entre los exones 1 y 2 de SRSF3, más otro sitio LoxP entre el exón 3 y 4. Cruzamos dichos ratones con unos ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de la polimerasa II y de forma inducible con tamoxifeno (PolII-mER-Cre-mER). Para conseguir que el sistema Cre/loxP sea inducible, se ha utilizado la recombinasa CreERT2, a la que se le ha fusionado un receptor de estrógenos mutado. De esta forma, la recombinasa Cre solo se activa y se transporta al núcleo tras la unión del ligando del receptor de estrógenos 4-hydroxytamoxifeno (tamoxifeno). Mediante dosis bajas de tamoxifeno, seleccionamos aquellos ratones en los que solo había recombinado el cassette de la neomicina. De esta forma, establecimos una línea de ratones en la que los exones 2 y 3 de SRSF3 se encuentran flanqueados por sitios LoxP.

Posteriormente procedimos a cruzar esta línea con ratones que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor del gen Nkx2.5; o con ratones α MHC-Cre, que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor cardio-específico de la cadena pesada de la miosina. Ambos cruces resultaron ser letales en estadíos embrionarios por lo que las líneas se mantuvieron en heterocigosis para el alelo floxeado de SRSF3. Además, generamos la línea SRSF3 KO cruzando los ratones SRSF3 floxeados con ratones α MHC-mER-Cre-mER. Al ser viables en ausencia de tamoxifeno, los ratones se mantuvieron en homocigosis. Como ratones control mantuvimos también la línea α MHC-mER-Cre-mER.

Para el genotipado se lisaron los fragmentos de cola en 30 μ l de buffer de lisis (1 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 0.5 mg/ml Proteinasa K) durante una hora a 55°C. Posteriormente, se pasó 1 μ l de lisado a una solución de inactivación con SDS y NP40 al 0.1%, y de esta solución se usó 1 μ l para la PCR. El genotipado del alelo floxeado de SRSF3 se realizó mediante la amplificación de los exones 2 y 3 incluyendo los sitios LoxP utilizando los primers X16X3i y Xi3Ri. Se realizaron 37 ciclos de amplificación con 30 segundos 93°C, 30

segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C. Por otro lado, el genotipado de la presencia de la recombinasa Cre se llevó a cabo amplificando una región de dicha recombinasa. En este caso se realizaron 35 ciclos con 30 segundos 94°C, 30 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C. Por último, el genotipado de la presencia de la recombinasa Cre inducible se llevó a cabo amplificando una región de la Cre inducible. Se realizaron 30 ciclos con 30 segundos 94°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C. Las secuencias de los primers utilizados se encuentran en la Tabla 2.

Tratamiento con tamoxifeno

Para inducir la activación de la recombinasa Cre y la consecuente recombinación de los exones 2 y 3 de SRSF3, se trató a los animales con 3 dosis de 1 mg de tamoxifeno cada una en 3 días no consecutivos. Al frasco de 50 mg de 4-hydroxytamoxifeno (H6278, Sigma) se añadieron 500 µl de etanol 100% y se incubó a 55°C con agitación durante una hora, hasta su completa disolución. Posteriormente se añadieron a 4.5 ml de aceite de maíz (C8267, Sigma) previamente calentado y se incubó a 55°C con agitación durante una hora. Una vez disuelto, se mantuvo a 4°C hasta su uso. Justo antes de la inyección se calentó a 37°C durante 10 minutos y se inyectó por vía intraperitoneal 100 µl por animal y día.

Análisis ecocardiográfico

La ecocardiografía transtorácica (Vevo 2100, VisualSonic, Toronto, Canadá) fue realizada siempre por el mismo operador, de forma ciega, utilizando una sonda lineal de 30 MHz. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (Esteve Veterinaria, Proyma Ganadera S.L., Ciudad Real, España) y emplazados en una placa térmica ajustada a 38.3°C para mantener la temperatura corporal en condiciones de normotermia. El isoflurano se administró con oxígeno al 100%, a través de una mascarilla nasal y utilizando inicialmente una concentración de

isoflurano del 2% para la inducción, y del 1.5% para el mantenimiento. La frecuencia cardíaca (FC) se monitorizó constantemente, utilizando 4 electrodos conectados a la placa térmica. La concentración de isoflurano administrado se ajustó con el objetivo de mantener la FC en 450-550 latidos por minuto, para mantener al ratón en un plano superficial durante la adquisición de las imágenes ecográficas.

Para evaluar la función sistólica del ventrículo izquierdo (VI) se utilizó el método de área-longitud, adquiriendo y grabando las imágenes correspondientes al eje paraesternal largo (LAX) en modo bidimensional (Ram *et al.*, 2011) . Los datos obtenidos fueron el volumen telediastólico y telesistólico del VI, así como la fracción de eyección. El análisis de las imágenes también se hizo de forma ciega, utilizando la estación de trabajo del equipo (Vevo 2100 analysis software, VisualSonic, Toronto, Canadá).

RNA-Seq

Para la secuenciación del RNA (RNA-Seq), se extrajo RNA total de corazones a día 5 tras la inducción con tamoxifeno. La extracción se realizó con el kit de aislamiento de RNA de Qiagen (74104, Qiagen), tratando las muestras con DNAsa. Se aisló RNA de 3 ratones SRSF3 KO y 3 ratones control. El proceso de secuenciación fue realizado por la Unidad de Genómica del CNIC. Las librerías se prepararon haciendo selección positiva por polyA y la secuenciación se llevó a cabo usando la plataforma Illumina-Hiseq y asegurando 15 millones de lecturas por muestra. El alineamiento de las lecturas fue realizado por la Unidad de Bioinformática del CNIC. Para ello, las lecturas se mapearon en el transcriptoma de ratón GRCm38 y se cuantificaron usando RSEM v1.2.3. El análisis de expresión diferencial se realizó usando el paquete edgeR Bioconductor. Se consideraron cambios significativos aquellos con un p valor ajustado <0.05. El análisis de ontología genética se realizó usando el recurso libre GOrilla.

Construcciones de DNA

La construcción de la quimera SRSF3-GFP se realizó mediante la amplificación de SRSF3 y su inserción en pEGFP-N1. El clonaje de los cDNAs para la producción de RNA modificados se realizó según el protocolo descrito por Pankaj K. Mandal y Derrik Rossi (Mandal and Rossi, 2013). Brevemente, la región codificante de GFP o SRSF3-GFP fue fusionada a una región 5'UTR que contenía un sitio de unión para la T7 junto a una secuencia Kozak, y a la región 3'UTR de la alfa globina para favorecer unos altos niveles de expresión (Figura 6A).

Las construcciones utilizadas para el ensayo de estabilidad de mRNA fueron cedidas por el laboratorio de Franck Dequiedt (Rambout *et al.*, 2016). Al plásmido de MS2-CP se fusionó el cDNA de SRSF3 mediante su amplificación y su inserción en la región 3' de MS2-CP.

Las construcciones de los virus adeno-asociados (AAV) se realizaron clonando SRSF3 o SERCA2A tras el promotor CMV en un vector que contiene las secuencias ITR necesarias para el empaquetamiento del DNA dentro de la cápsida viral. La región codificante de SRSF3 se obtuvo por amplificación por PCR, mientras que la de SERCA2A se obtuvo a partir de un vector cedido por el grupo de Roger J. Hajjar. En el caso del virus AAV-SRSF3, a continuación de SRSF3 se clonó IRES-Luciferasa para que el DNA tuviera el tamaño óptimo para su empaquetamiento. Ambos virus contienen al final de las secuencias codificantes el polyA de SV40 (Figura 6B, C).

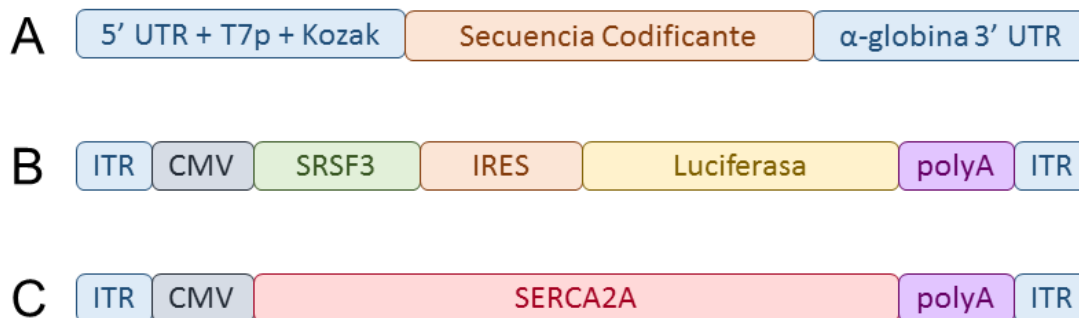


Figura 6. Esquema de plásmidos. **A**, Esquema de las construcciones empleadas para la síntesis de RNAs modificados según el protocolo descrito por Pankaj K. Mandal y Derrik Rossi. **B-C**, Esquema de las construcciones utilizadas para la producción de los virus adeno-asociados AAV-SRSF3 (B) y AAV-SERCA2A (C).

Todas las amplificaciones por PCR se realizaron usando el kit de alta fidelidad KAPA HiFi HotStart ReadyMixPCR kit (KR0370, Kapa Biosystems) y se clonaron en el vector pGEM-T Easy (A1360, Promega) para proceder a su secuenciación antes de clonarlos en el vector final.

Producción de RNA modificado

La producción y purificación de los RNAs modificados (modRNA) se realizó usando el kit de transcripción MegaScript T7 (AM1334, Thermo Fisher Scientific). Para evitar la activación de la vía de señalización del interferón se incluyeron dos nucleótidos modificados: 5-methyl-CTP y pseudo-UTP (N-1014 y N-1019, Trilink). Estos nucleótidos producen un cambio en la estructura de la cadena de RNA que evita su detección por parte del sistema del interferón, a la vez que permite su traducción por el ribosoma (Karikó *et al.*, 2005; Warren *et al.*, 2010). Así mismo, se añadió un grupo CAP al inicio del transcrito durante el proceso de transcripción in vitro. No obstante, se ha descrito que este proceso sólo es eficiente aproximadamente en un 60% de las moléculas, por lo que los transcritos producidos requerían ser desfosforilados tras su purificación. La desfosforilación de los RNA se realizó a 37°C durante 30 minutos en un bloque térmico usando fosfatasa alcalina (M0289S, NEB). Tras la desfosforilación los transcritos fueron purificados con el kit MEGAclean Transcription Clear-Up (AM1908, Thermo Fisher Scientific).

Aislamiento y transfección de cardiomiocitos neonatales

Los cardiomiocitos neonatales fueron extraídos de ratones C57BL/6 el mismo día del parto o un día después según el protocolo previamente descrito (Brand *et al.*, 2010). Brevemente, se extrajeron los corazones neonatales, se hicieron digestiones parciales con Colagenasa Tipo 2 (LS004176, Worthington) y se fueron guardando las células extraídas en suero fetal bovino hasta la completa digestión de los corazones. Se plaquearon un total de 8 millones de células en placas de 10

cm² preincubadas con gelatina 1% y se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 20% medio 199, 15% suero fetal bovino, 15% HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico) y 2mM L-glutamina. Al día siguiente de la extracción cada placa fue transfectada con 15 µg del correspondiente modRNA usando 21 µl de Lipofectamina 2000 (11668027, Thermo Fisher Scientific). Tras 6 horas de transfección, las células se lavaron y se cultivaron durante 48 horas con medio suplementado con 100 µM de BrdU para evitar la proliferación de otros tipos celulares.

Inmunoprecipitación de RNA (RIP)

Los cardiomiocitos neonatales transfectados con los modRNA de SRSF3-GFP o GFP respectivamente se resuspendieron en buffer de lisis RIPa suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa y con el inhibidor de RNAsas RNasin (N2611, Promega). Luego se trataron con DNasa (AM1907, Thermo Fisher Scientific) durante 3 minutos a 37°C. Se realizó la inmunoprecipitación utilizando bolas magnéticas GFP-Trap (gtm-20, Chromotek) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se procedió a la digestión de las proteínas y la extracción del RNA asociado según el protocolo descrito por Miriam Gagliardi y Maria R. Matarazzo (Gagliardi and Matarazzo, 2016). Finalmente se sintetizó el cDNA utilizando 100 ng de RNA total por muestra con el kit de Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription. Para la qRT-PCR se utilizó SYBR Green y el cDNA se amplificó con los primers indicados la Tabla 1. Los resultados se analizaron con el programa LinRegPCR. Los valores se normalizaron con respecto a los valores de los inputs y se representa el enriquecimiento de cada gen con respecto a GAPDH.

Ensayo de estabilidad de RNA

Para estudiar el efecto de la unión de SRSF3 sobre la estabilidad del mRNA, se siguió el protocolo previamente descrito (Rambout *et al.*, 2016). Se plaquearon células P19 en placas de 24 pocillos y se transfectaron al alcanzar un 50-60% de

confluencia. La transfección se realizó con las siguientes combinaciones de plásmidos: MS2-CP-SRSF3 + Rluc8, MS2-CP-SRSF3 + Rluc0, MS2-CP + Rluc8 o MS2-CP + Rluc0. Las condiciones de transfección fueron 2 µl de Lipofectamina 2000 y 0.5 µg de cada plásmido por pocillo. Se transfectó durante 6 horas y se mantuvieron las células con medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino y 2 mM L-glutamina. Las células se trataron 48 horas después de la transfección con 10 µg/ml de actinomicina D (ActD) (A9415, Sigma). Se fueron recogiendo las células a distintos tiempos tras la adición de ActD: 1h, 2h, 4h y 8h para mRNA; y 4 h, 8 h y 24 h para medir actividad de la luciferasa. Para el análisis del RNA se realizó la extracción y la qRT-PCR según se ha descrito en el primer apartado. Las secuencias de los primers están en la Tabla 1. El análisis de la actividad de la luciferasa se realizó utilizando el kit de Dual-Luciferase Reporter Assay (E1980, Promega) y el luminómetro de tubo Sirius (Berthold). Los valores de R-Luc se normalizaron con los de F-Luc en ambos casos para compensar diferencias debidas a la eficiencia de transfección.

Análisis proteómico y co-inmunoprecipitación

Para la detección de las proteínas que interaccionan con SRSF3, se partió de cardiomiocitos neonatales de ratón transfectados con modRNAs de SRSF3-GFP o GFP. Las células se resuspendieron en buffer de lisis suave (50 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% IGEPAL) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se inmunoprecipitó usando las bolas magnéticas GFP-Trap durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se procedió al análisis de proteómica o se analizaron las muestras por western blot utilizando los anticuerpos anti-GFP (632592, Clontech) y anti-LMS14A (ab229277, Abcam). El análisis de proteómica cuantitativa realizado al extracto inmunoprecipitado corrió a cargo de la Unidad de Proteómica del CNIC. Dicho extracto se sometió a digestión proteica seguida de cromatografía nanolíquida acoplada a espectrometría de masas para la identificación proteica y su cuantificación mediante conteo de péptidos. Para la representación esquemática de los resultados se usó el recurso libre String (Szklarczyk *et al.*, 2017).

Análisis de decapping

Para la cuantificación de los mRNA decapped (sin “cap”) se siguió el protocolo descrito por Vincent Pelechano, Wu Wei y Lars M Steinmetz (Pelechano, Wei and Steinmetz, 2016). Brevemente, se partió de 4 µg de RNA total, se trató con DNAsa y se procedió a la ligación del primer rP5_RND, que se liga específicamente en el extremo 5' de los mRNA que han perdido el cap y presentan un fosfato en su extremo 5'. Tras la ligación se procedió a la síntesis del cDNA utilizando 100 ng de RNA total por muestra con el kit de Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription. Para la qRT-PCR se utilizó SYBR Green y el cDNA se amplificó con los primers indicados la Tabla 1. Los resultados se analizaron con el programa LinRegPCR. Los valores se normalizaron con la expresión del mRNA total correspondiente.

Producción de virus adeno-asociados

La producción de los virus adeno-asociados se llevó a cabo en la Unidad de Vectores Virales del CNIC a quienes se les proporcionaron las construcciones de DNA de los mismos. Previamente se comprobó la correcta secuencia de los ITRs mediante digestiones con BglI y AhdI. La producción vírica se llevó a cabo en células HEK293 y utilizando las proteínas de la cápsida de serotipo 9. Los títulos obtenidos fueron de $1.47 \cdot 10^{13}$ partículas virales (VP)/ml para AAV-SRSF3 y de $4.20 \cdot 10^{12}$ VP/ml para AAV-SERCA2A.

Inyección de virus adeno-asociados por vena femoral

Para la administración de los virus adeno-asociados se anestesió a los ratones usando 3-3.5% de sevoflurano administrado con oxígeno al 100%. Se mantuvo al ratón bajo anestesia hasta el final de la inyección utilizando una mascarilla nasal. Para la administración del virus se desinfectó la piel del ratón con etanol y se realizó un corte en la piel de la extremidad trasera que permitiese visualizar la vena femoral. A través de dicha vena se inyectó un total de 50 µl por

ratón, conteniendo $1 \cdot 10^{11}$ partículas virales (VP). Al finalizar se suturó la piel del animal y se esperó a la completa recuperación de la anestesia antes de devolverlo a su caja.

Cirugía de infarto de miocardio

El infarto de miocardio se llevó a cabo mediante la ligación permanente de la arteria coronaria descendiente izquierda. Para ello, los ratones fueron anestesiados usando 3-3.5% de sevoflurano administrado con oxígeno al 100%, intubados y mantenidos con ventilación mecánica durante el procedimiento. La cirugía se realizó rasurando el pelo del tórax del animal, desinfectando la piel con etanol y realizando un corte en el tórax que permitiera la visualización de la arteria coronaria. Tras la ligación de dicha arteria con una sutura no reabsorbible, se procedió a suturar al animal. Todos los animales recibieron una dosis de buprenorfina (0.1 mg/kg) como analgesia durante los días posteriores al procedimiento.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se usaron: T-Test para dos condiciones a un tiempo, ANOVA de 1 vía seguido del post-test de Bonferroni para más de dos condiciones a un tiempo, y ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni para análisis de múltiples condiciones y dos variables, como se indica en la leyenda de las figuras. Los datos se analizaron con GraphPad Prism 5.0 y los cambios se consideraron significativos a partir de $p < 0.05$.

Tabla 1. Secuencia de los primers de SYBR Green utilizados para la qRT-PCR (5'-3').

Gen	Fw	Rv
SRSF3	TCGTCGTCCTCGAGATGATT	CTCCTTCTTGGGGATCTGC
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAG	AGATCCACGACGGACACATT
SRSF3 NMD	TGGAAGTGTGAATGGTGAA	GACGCTGAAAGGGCTAGTTG
SRSF3 E2-3	ATCGTGATTCTGTCCCTTG	TTCACCATTTCGACAGTTCCA
SRSF3 E4-5	ATCCCCAAGAAGGAGAAGC	ATCGAGACGGCTTGTGATTT
BNP	GCCAGTCTCCAGAGCAATTC	TCTTTTGTGAGGCCTTGGTC
Acta1	CCAGAGTCAGAGCAGCAGAA	CAAAGCCAGCTTTCACCAG
SERCA2A	GAGGAAGGGGAAGAAACGAT	TCGATACACTTTGCCCATTTTC
RyR2	CCGGTCTTCCACTGACAAAC	GAGGACACGCTGACCAAGAT
MYBPC3	GGTCAAGATTGACTTTGTGCCTA	CAGACCACAGTGGGAGCAG
TNNT2	GCGGAAGAGTGGGAAGAGACAGAC	GCACGGGGCAAGGACACAAG
MYH7	CAACTGGAGGAGGAGGTCAA	CCTCTGTATGGCATCCGTCT
MYH6	ATGTTAAGGCCAAGGTCGTG	GTAGCGCTCCTTGAGGTTGT
TNNI3	GAAGCAGGAGATGGAACGAG	TGACTTTTGCTTCCACGTCA
R-Luc	TCTTTTTTCGCAACGGGTTT	GCCCAGTTTCTATTGGTCTCC
F-Luc	TGAGAACTTCAGGCTCCTGG	GCCTTATGCAGTTGCTCTCC
SERCA2A Decap	CTACACGACGCTCTTCCGAT	AGCCCCTCAGCTCTGCAC
RyR2 Decap		GTGAGGACGCAGGGAGGA
MYBPC3 Decap		TACTTGTCATTGGCGGTGAT
MYH7 Decap		CAGCTCCCACTCCTACCTGA
SMG1	TCTGCGAAAGATGAGGTGAA	AACGAGCCACCAAAAGAATG
SMG8	AACCCTCCTGTGCTCTACCA	TGATCCAATTTCCCACAACA
SMG9	CCTGGGCTCTACGGGATAG	GAGAGGATGATGGGGGTTTTT
SMG6	CCCCAGTGTGAAAGTCTGGT	AGGGTGAGGTCATCATCTGG
RBM8A	TGTCACTGGAGTCCACGAAG	CACCAGTCCCACTGATTGG
SERCA2A NMD	TGTTTTCTCCAATGCCTTC	CTTTTCCCCAACCTCAGTCA

Tabla 2. Secuencia de los primers para genotipar los ratones SRSF3 KO y α MHC-mER-Cre-mER (5'-3')

Nombre	Secuencia
X16X3i	GCGCAGGTACTTGAGAGA
Xi3Ri	CCCTTTTATTGGTCAGTGA
Cre Fw	TGACGGTGGGAGAATGTTAAT
Cre Rv	GCCGTAAATCAATCGATGAGT
mER-Cre-mER Fw	CTAGGCCACAGAATTGAAA
mER-Cre-mER Rv	GTAGGTGGAAATTCTAGCA

RESULTADOS

Descripción de la expresión de SRSF3 en el corazón

La expresión de SRSF3 disminuye con la edad

SRSF3 se expresa desde estadios embrionarios muy tempranos y se ha descrito que dicha expresión es esencial para la correcta formación del blastocisto (Jumaa, Wei and Nielsen, 1999). También ha sido descrito que su expresión en el hígado es crucial para una correcta función metabólica (Sen, Jumaa and Webster, 2013). Sin embargo, su patrón de expresión en el corazón aún no se conoce.

Para investigar el patrón de expresión cardiaco de SRSF3, extrajimos corazones de ratones desde estadio embrionario E12.5 hasta 6 meses de edad y cuantificamos los niveles de expresión del mRNA de SRSF3 por qRT-PCR. Los resultados mostraron que la expresión de SRSF3 es alta a E12.5 y disminuye progresivamente durante los últimos estadios del desarrollo embrionario y durante el periodo postnatal (Figura 7A).

Mediante hibridación *in situ* en embriones desde E9.5 hasta E14.5, descubrimos que el corazón es de los últimos tejidos en lo que SRSF3 comienza a expresarse, no siendo detectable claramente hasta E12.5. Por el contrario, podemos observar como su expresión en otros tejidos es más temprana (Figura 7B). También realizamos inmunofluorescencias en secciones de corazones de ratones en los días 1 y 7 tras el parto (P1 y P7) y a un mes de edad (1M) para comprobar la localización de SRSF3 en los cardiomiocitos. Tal y como estaba previamente descrito, dicha expresión se centra fundamentalmente en el núcleo celular (Änkö, 2014) (Figura 7C).

Con estos resultados podemos concluir que la expresión más alta de SRSF3 en el corazón se produce durante el desarrollo embrionario y que va disminuyendo con la edad hasta alcanzar la edad adulta, donde la expresión permanece estable.

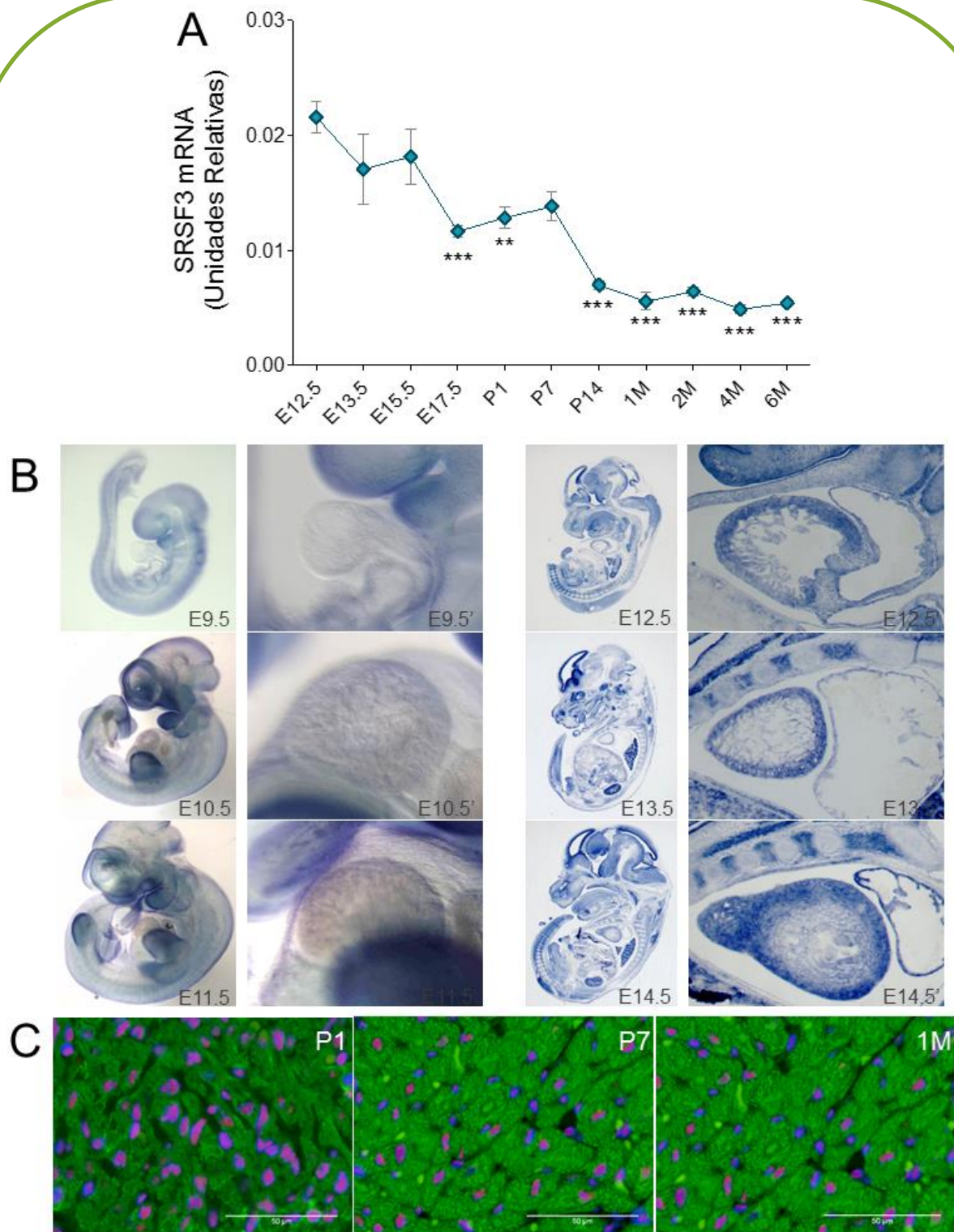


Figura 7. La expresión de SRSF3 disminuye con la edad. **A**, La expresión de SRSF3 se cuantificó por qRT-PCR en corazones extraídos de ratones C57BL/6 de distintas edades desde estadios embrionarios (E) hasta días (P) y meses (M) post-parto. Los datos están representados como la media \pm SE. $n=3-4$ ratones por grupo. $**p<0.01$, $***p<0.001$ vs E12.5, ANOVA de una vía con test de Bonferroni de comparación múltiple. **B**, Hibridación *in situ* de SRSF3 en diferentes estadios embrionarios. **C**, Inmunofluorescencia realizada en corazones extraídos de ratones C57BL/6 a diferentes edades, usando anti-SRSF3 (rojo), anti-TroponinaT (verde) y DAPI (azul). Barra, 50 μ m.

La expresión de SRSF3 disminuye tras el infarto de miocardio

Para el estudio del posible papel de SRSF3 en la enfermedad cardiaca, decidimos estudiar si su expresión varía en la zona remota tras MI. Los resultados mostraron que tanto la expresión del mRNA como de la proteína de SRSF3 se ven disminuidas tras MI (Figura 8A, B). Esto sugiere que SRSF3 puede desempeñar un papel en la homeostasis y/o enfermedad cardiaca.

Se ha descrito anteriormente que SRSF3 se regula por el splicing alternativo del exón 4, cuya inclusión conlleva la degradación del mRNA a través del proceso de non-sense mediated decay (NMD) (Jumaa and Nielsen, 1997). Para determinar si la bajada de expresión de SRSF3 observada tras MI podría estar causada por dicha regulación, analizamos la presencia del exón 4 mediante qRT-PCR. Tal y como se muestra en la Figura 8C, observamos un enriquecimiento de la isoforma que incluye el exón 4.

SRSF1 ha sido previamente descrito como regulador de este proceso, inhibiendo la inclusión y promoviendo como consecuencia la isoforma sin el exón 4 (Jumaa and Nielsen, 1997). Partiendo del enriquecimiento observado tras MI de la isoforma que incluye el exón 4, nos preguntamos si la expresión de SRSF1 estaba también afectada. Tal y como esperábamos, observamos una bajada en la expresión proteica de SRSF1 tras MI (Figura 8D). Estos resultados sugieren que la pérdida de SRSF1 tras MI puede producir un incremento en la isoforma de SRSF3 que incluye el exón 4, provocando como consecuencia una bajada en la expresión de SRSF3 tras MI.

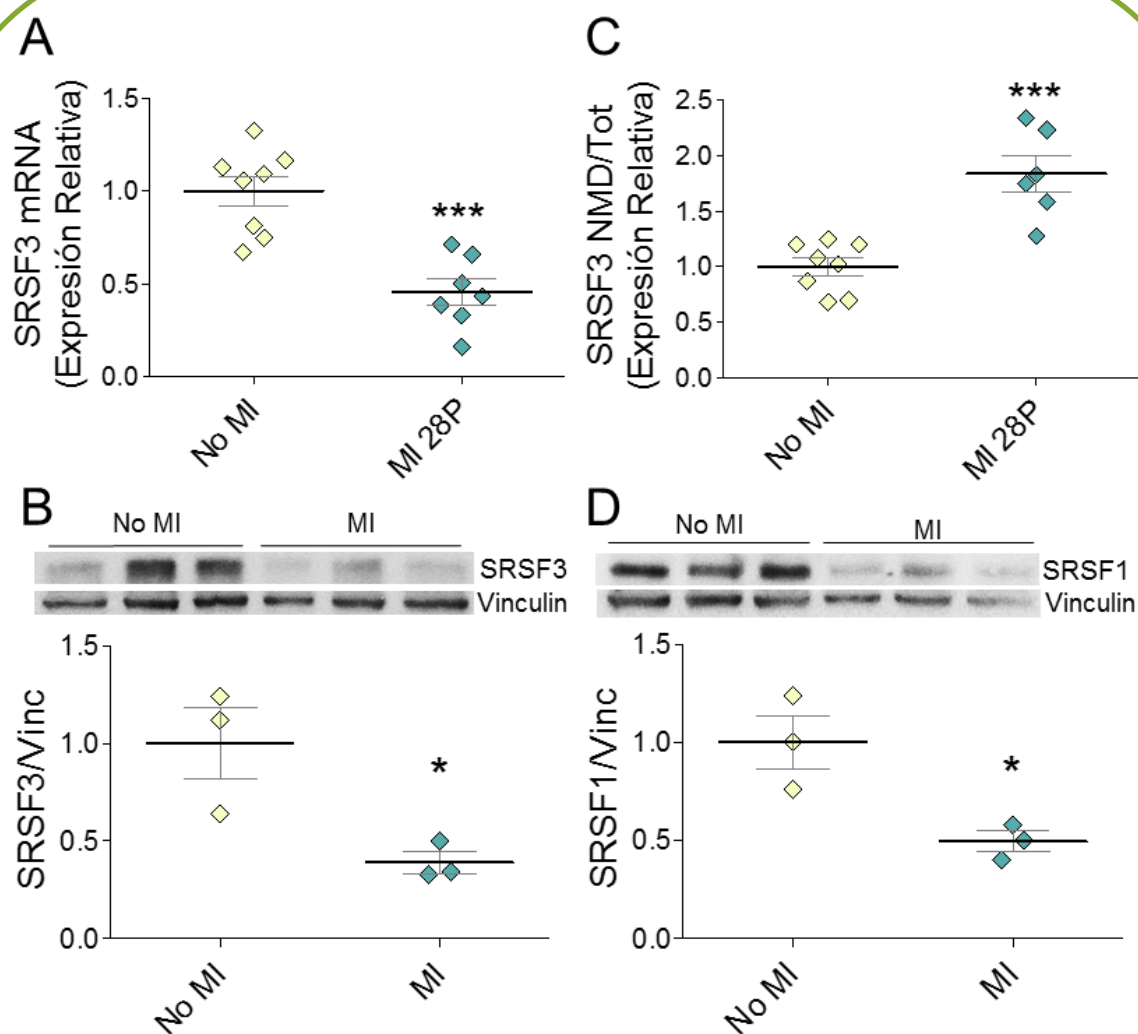


Figura 8. La expresión de SRSF3 se ve disminuida tras infarto de miocardio. **A**, La expresión de SRSF3 se cuantificó en la zona remota 28 días después de inducir un infarto de miocardio (MI) y en corazones control sin infarto mediante qRT-PCR. **B**, Los niveles proteicos de SRSF3 se determinaron en la zona remota tras MI por western blot y se cuantificaron. **C**, La isoforma de NMD de SRSF3 se cuantificó en la zona remota tras MI y en corazones control por qRT-PCR y se normalizó contra la expresión total de SRSF3. **D**, La expresión proteica de SRSF1 en la zona remota tras MI y en corazones control se determinó por western blot y se cuantificó. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. T-test.

Caracterización de la función de SRSF3 en el corazón adulto

La pérdida de SRSF3 en el corazón durante el desarrollo conlleva la muerte de los embriones

Para investigar la función de SRSF3 en el corazón, generamos un modelo de ratón knockout (KO) cardio-específico. Para ello utilizamos unos ratones previamente generados por el laboratorio de Peter J. Nielsen (Jumaa, Wei and Nielsen, 1999), en los que los exones 2 y 3 de SRSF3 se encuentran flanqueados por sitios LoxP. Como consecuencia, en las células en las que se exprese la recombinasa Cre de forma activa, se producirá la recombinación de los exones 2 y 3, esenciales para la traducción de SRSF3 (Figura 9A). Para producir la recombinación específicamente en corazón, cruzamos dicha línea con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor Nkx2.5. Al analizar las camadas de estos ratones encontramos que se producía mortalidad embrionaria ya que no nace ningún ratón homocigoto para el alelo floxeado de SRSF3. Para restringir la depleción de SRSF3 solo a cardiomiocitos, generamos una nueva línea cruzando los ratones SRSF3 floxeados con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor cardio-específico de la cadena pesada de la miosina (α MHC). De nuevo, no obtuvimos ningún ratón homocigoto para el alelo floxeado de SRSF3 en las camadas de estos cruces, sugiriendo que la expresión de SRSF3 en cardiomiocitos es esencial para el correcto desarrollo cardiaco y la supervivencia de los embriones.

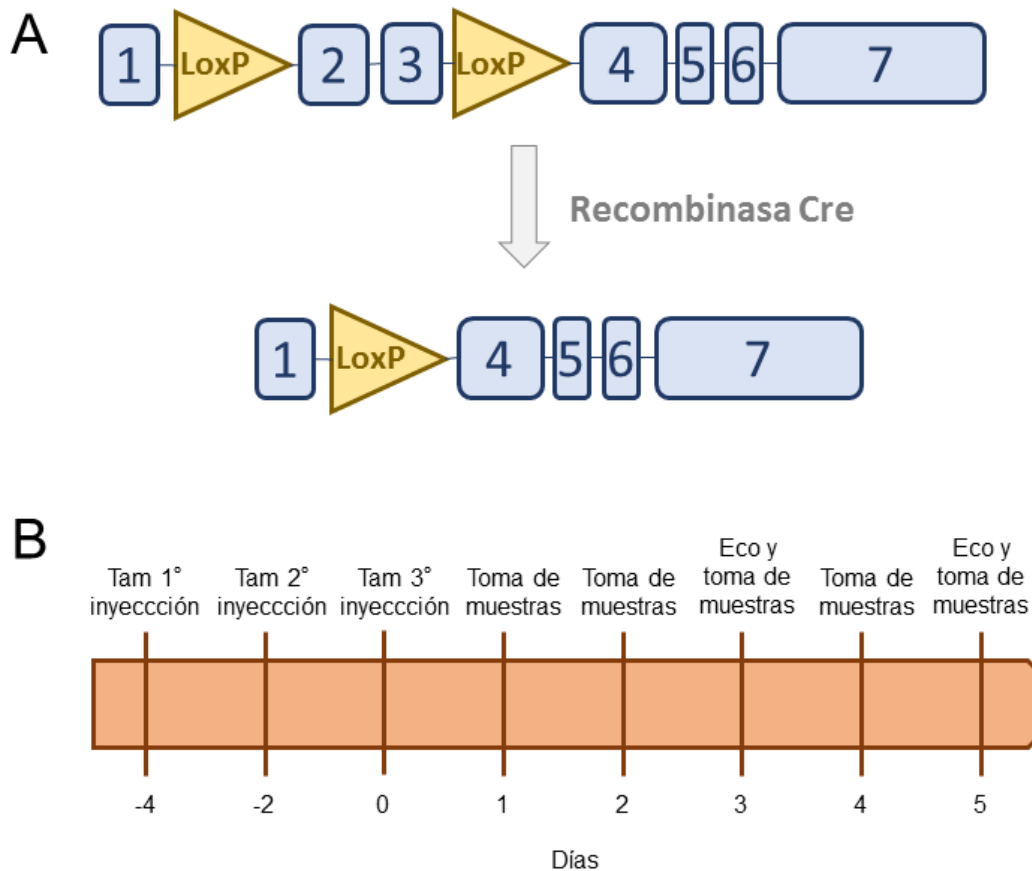


Figura 9. Modelo de depleción SRSF3. **A**, Esquema de la modificación genética introducida en el gen SRSF3. Tras la recombinación de los sitios LoxP mediada por la recombinasa Cre, se produce la pérdida de los exones 2 y 3. **B**, Esquema de la activación de la recombinasa Cre. Los ratones reciben 3 inyecciones de tamoxifeno (Tam) en días no consecutivos para inducir la recombinación y se procede a la toma de muestras y análisis de la función cardíaca por ecocardiografía (Eco) hasta 5 días después de la inducción.

Los ratones SRSF3 KO cardio-específicos mueren de forma prematura y desarrollan problemas de contracción

Con el objetivo de estudiar la función de SRSF3 en el corazón adulto, cruzamos los ratones SRSF3 floxeados con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor α MHC, pero en este caso de forma inducible (α MHC-mER-Cre-mER). Indujimos la recombinación de los exones mediante 3 inyecciones de tamoxifeno en días no consecutivos en ratones de 10 semanas de edad. Durante los 5 días siguientes a la inducción analizamos tejido y función cardiaca (Figura 9B). Como controles utilizamos ratones α MHC-mER-Cre-mER a los que les administramos el mismo tratamiento.

Tras la inducción con tamoxifeno, observamos que la depleción de SRSF3 ocurre bastante rápido, siendo evidente ya el primer día tras la inducción de la recombinación para el mRNA y un día después para la proteína (Figura 10A, B). Para asegurarnos de la especificidad de tejido de la recombinación, realizamos inmunofluorescencia en secciones de corazones a día 5 y comprobamos que la expresión de SRSF3 solo se pierde en los cardiomiocitos. Sin embargo, la eficiencia de la recombinación no es del 100%, ya que algunos cardiomiocitos continúan expresando SRSF3 (Figura 10C).

A diferencia de los ratones KO cardio-específicos de SRSF2 y SRSF1, en los que se observa una esperanza de vida normal o sobreviven varias semanas después del parto respectivamente (Ding *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005), nosotros observamos que ningún ratón SRSF3 KO fue capaz de sobrevivir más de 8 días tras la inducción de la recombinación con tamoxifeno (Figura 11). A través del análisis ecocardiográfico descubrimos que 5 días después de la última inyección, los ratones SRSF3 KO muestran una dramática reducción de la fracción de eyección y un incremento agudo del volumen en sístole del ventrículo izquierdo (VI) (Figura 12A, B). Sin embargo, no hay un cambio significativo del volumen diastólico del VI (Figura 12C), indicando que los corazones no se dilatan. Esto muestra que los ratones SRSF3 KO desarrollan graves problemas de contracción que muy probablemente son la causa de la muerte de los animales.

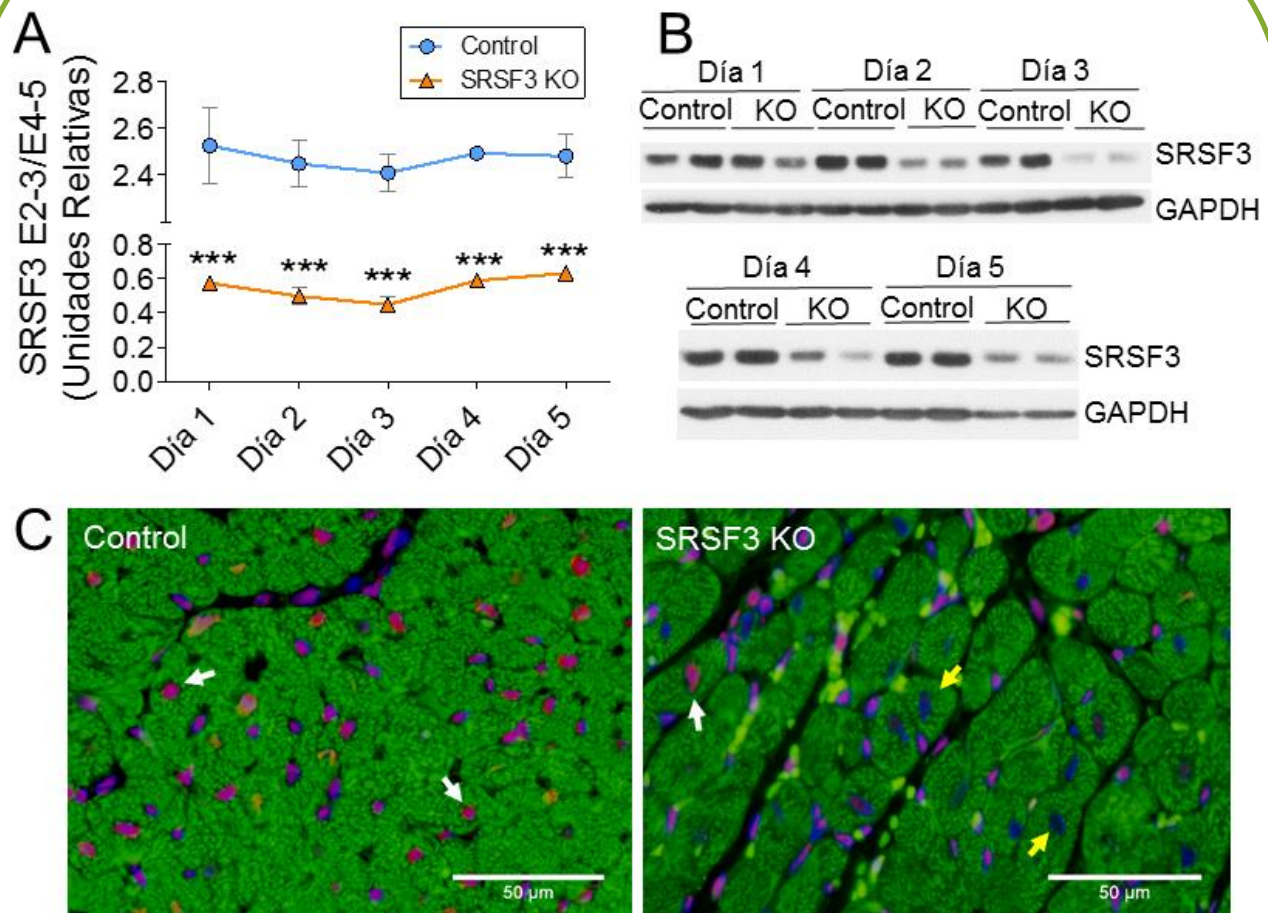


Figura 10. Los ratones SRSF3 Knockout (KO) carecen de la expresión de SRSF3 específicamente en los cardiomiocitos. **A**, La delección de los exones 2 y 3 de SRSF3 en el corazón fue analizada por qRT-PCR a diferentes tiempos tras la inducción. Los datos están representados como la media \pm SE. $n=5-13$ ratones por grupo. *** $p<0.001$ SRSF3 KO vs Control. ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni. **B**, Los niveles proteicos de SRSF3 en el corazón se analizaron por western blot varios días tras la inducción. **C**, Se realizó inmunofluorescencia en secciones de corazón de ratones Control y SRSF3 KO sacrificados a día 5 usando anti-SRSF3 (rojo), anti-TroponinaT (verde) y DAPI (azul). Las flechas indican cardiomiocitos expresando SRSF3 (blancas) o carentes de dicha expresión (amarillas). Barra, 50 μ m.

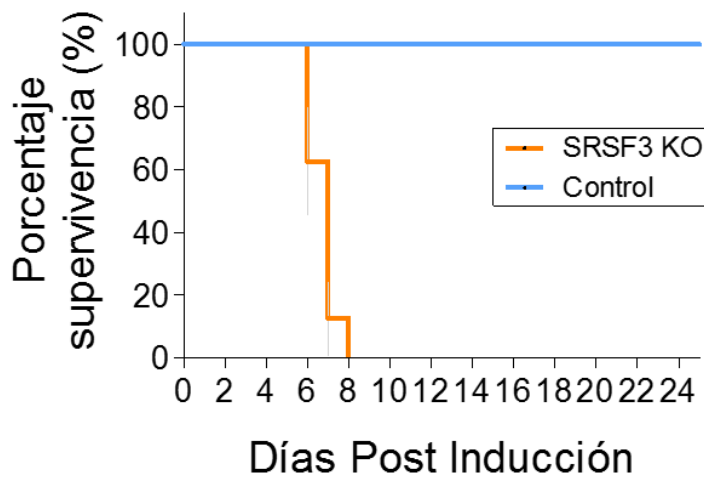


Figura 11. Los ratones SRSF3 KO cardio-específicos muestran una supervivencia reducida. Curva de supervivencia comparando ratones Control vs SRSF3 KO a varios tiempos tras la inducción de la recombinación con tamoxifeno.

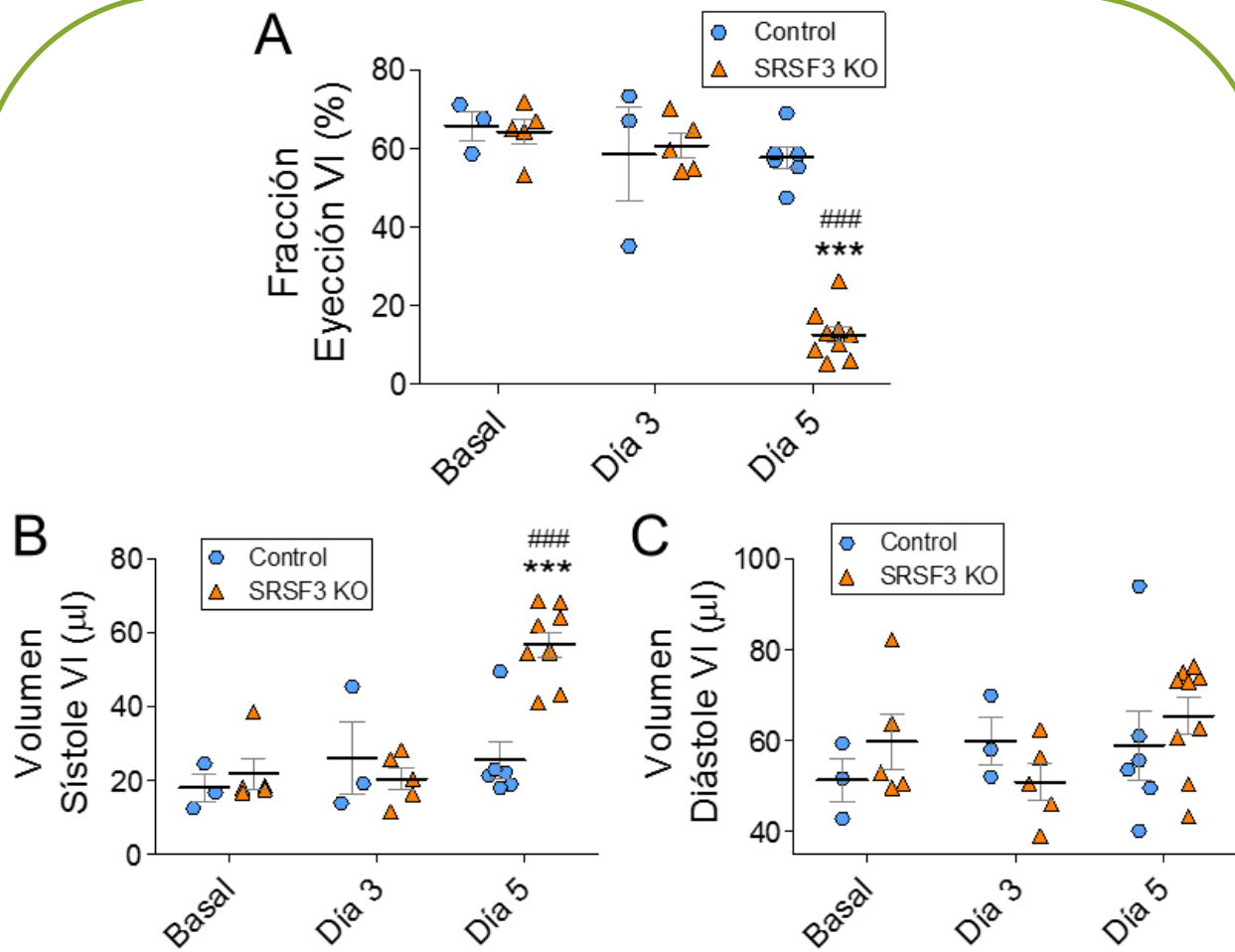


Figura 12. Los ratones SRSF3 KO cardio-específicos muestran problemas de contracción. La fracción de eyección (A), volumen sistólico (B) y volumen diastólico (C) del ventrículo izquierdo (VI) fueron calculados por análisis ecocardiográfico. *** $p < 0.001$ SRSF3 KO vs Control. ### $p < 0.001$ vs Basal. ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni.

Continuando con la caracterización de los ratones SRSF3 KO, cuantificamos la expresión de marcadores de disfunción cardíaca por qRT-PCR y descubrimos que tanto BNP como Acta1 se encuentran aumentados en los corazones de los ratones SRSF3 KO (Figura 13A, B), confirmando los resultados obtenidos en la ecocardiografía.

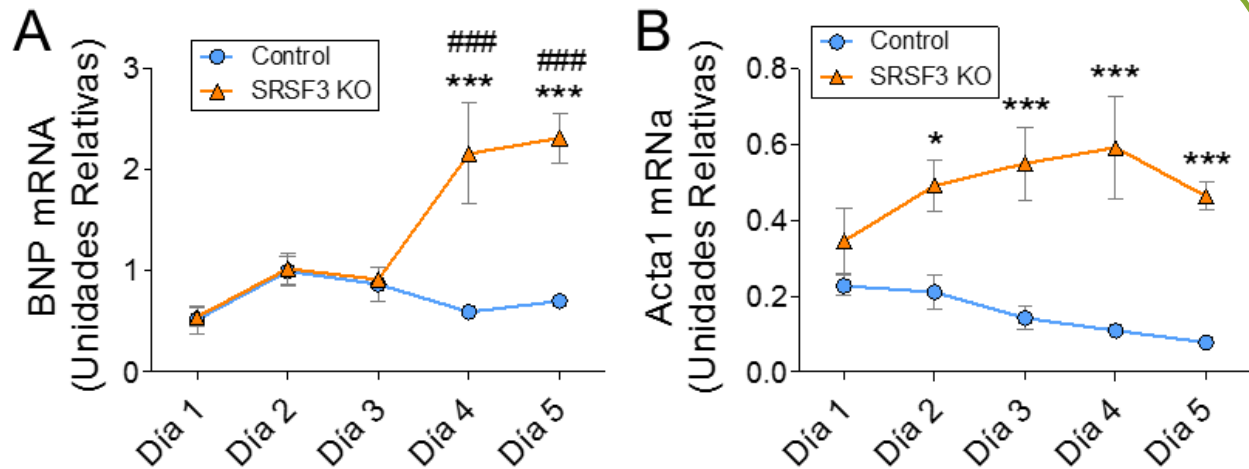


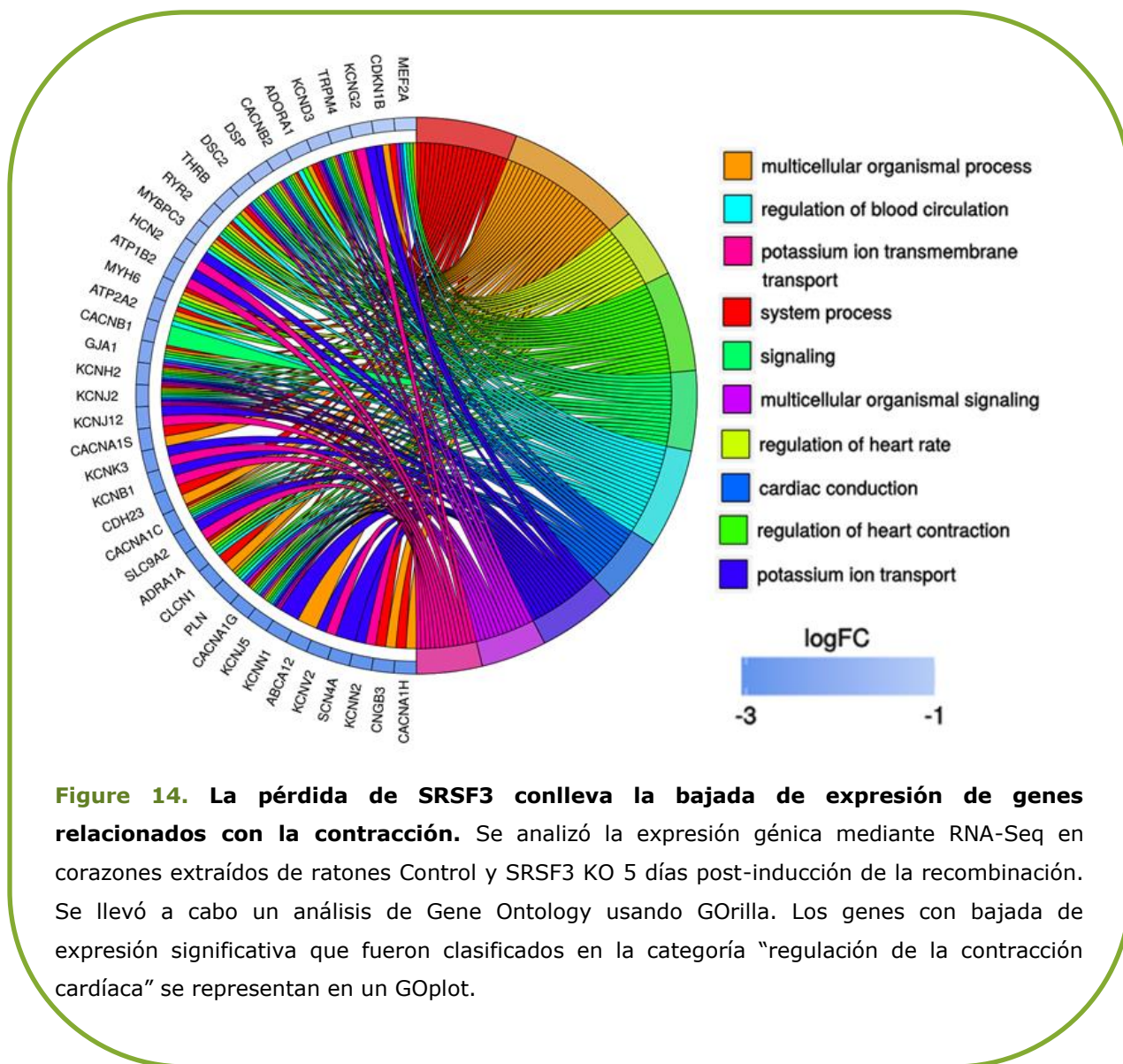
Figura 13. La pérdida de SRSF3 induce la expresión de marcadores de disfunción cardíaca. La expresión de BNP (A) y Acta1 (B) en los corazones fue cuantificada por qRT-PCR varios días tras la inducción. Los datos están representados como la media \pm SE. $n=5-13$ ratones por grupo. * $p<0.05$, *** $p<0.001$ SRSF3 KO vs Control. ### $p<0.001$ vs Día 1. ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni.

Caracterización del mecanismo molecular de acción de SRSF3 en el corazón adulto

La pérdida de SRSF3 conlleva la bajada la expresión de genes relacionados con la contracción

Para caracterizar los defectos de contracción, analizamos la expresión génica mediante RNA-Seq en corazones de los ratones SRSF3 KO y ratones control 5 días tras la inducción. Se obtuvieron más de 9,000 genes diferencialmente expresados de forma significativa tras la depleción de SRSF3 (Tabla Suplementaria 1). El

análisis de ontología genética mostró un enriquecimiento de genes relacionados con la contracción entre aquellos genes que sufren una bajada de expresión significativa (Figura 14). Posteriormente procedimos a la validación por qRT-PCR de algunos de estos genes (SERCA2A, RyR2, MYBPC3, TNNT2, MYH7 y MYH6) y observamos que la bajada de los mismos se produce desde el día 2 tras la administración de tamoxifeno (Figura 15). Sin embargo, los niveles de proteína de SERCA2A y MYH no sufren una bajada hasta el día 5 (Figura 16). Estos resultados apuntan a que la función cardíaca se mantiene normal hasta el día 5 tras la última inyección de tamoxifeno debido a que no es hasta entonces cuando se produce la pérdida de las proteínas de contracción.



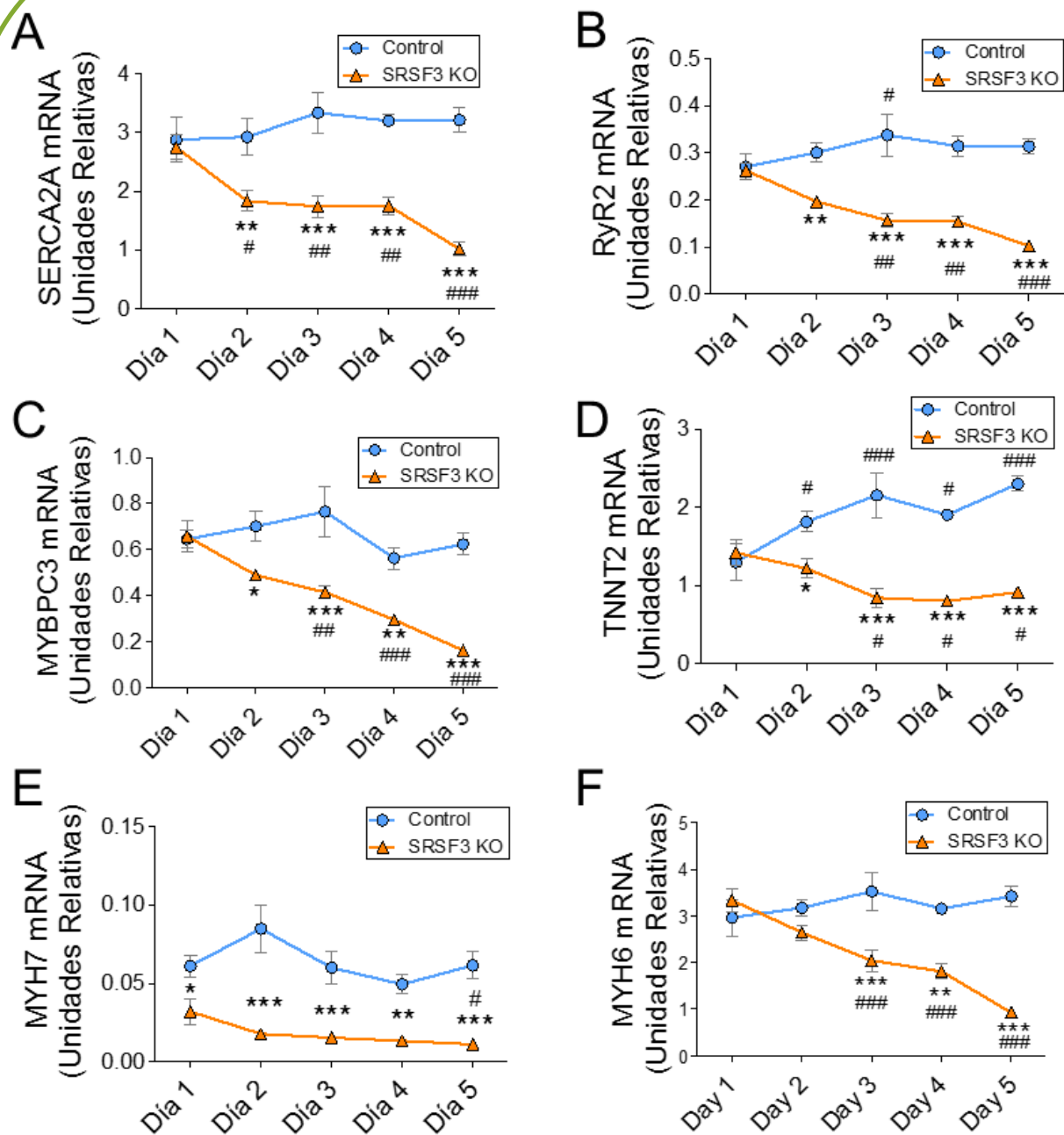


Figure 15. La bajada de expresión de los mRNAs de los genes relacionados con la contracción se produce desde día 2 tras la recombinación. La expresión de los mRNA de SERCA2A (A), RyR2 (B), MYBPC3 (C), TNNT2 (D), MYH7 (E) y MYH6 (F) en el corazón fue cuantificada por qRT-PCR varios días tras la última inyección de tamoxifeno. Los datos están representados como la media \pm SE. n=5-13 ratones por grupo. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 SRSF3 KO vs Control. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs Día 1. ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni.

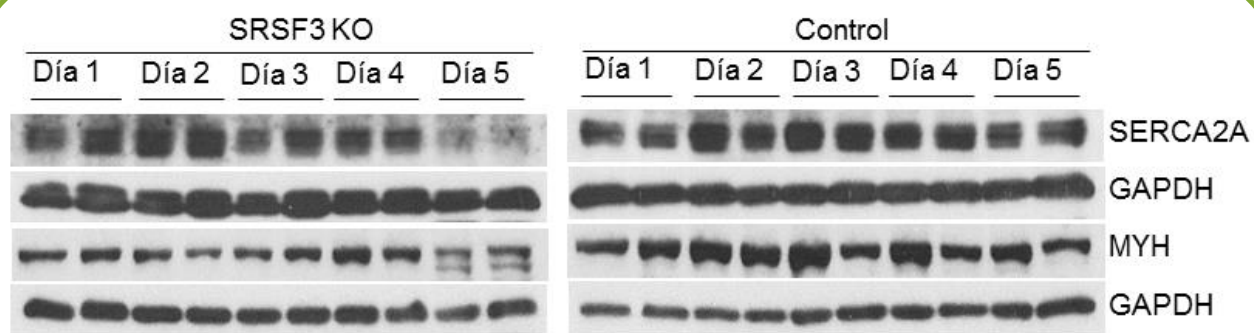


Figure 16. La bajada de expresión proteica de los genes relacionados con la contracción se produce a día 5 tras la recombinación. Los niveles de las proteínas MYH y SERCA2A se analizaron por western blot varios días tras la inducción de la recombinación.

Al ser SRSF3 una proteína de unión a RNA, decidimos investigar si SRSF3 se une directamente a estos genes. Para ello realizamos inmunoprecipitación de RNA (RIP). Aislamos cardiomiocitos de ratones C57BL/6 neonatales y los transfectamos con RNA modificado (modRNA) de SRSF3-GFP o GFP. Luego procedimos a la inmunoprecipitación de las proteínas usando bolas GFP-Trap en condiciones libres de RNAsas. A continuación cuantificamos la presencia de los mRNAs de los genes de contracción en los extractos inmunoprecipitados. Como resultado, obtuvimos un enriquecimiento de la unión de SERCA2A, TNNT2, MYH6 y TNNI3 a SRSF3 en comparación con GAPDH (Figura 17A-D), indicando que estos mRNAs son dianas de SRSF3.

Nuestros resultados sugieren que la pérdida de expresión de SRSF3 ocasiona una bajada en la expresión de los mRNAs de los genes relacionados con la contracción, algunos de ellos siendo dianas de SRSF3.

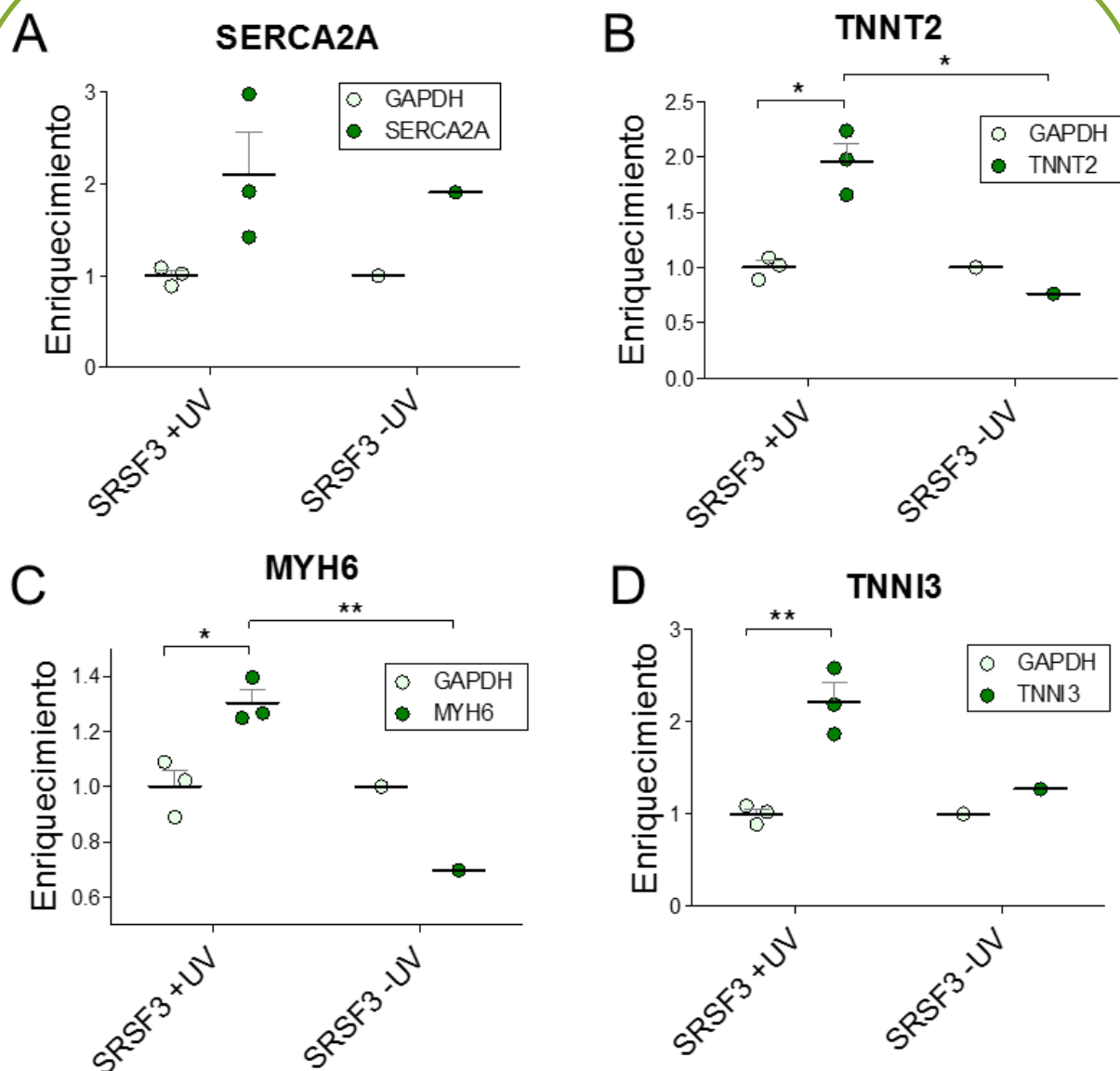


Figura 17. SRSF3 se une a genes relacionados con la contracción. A-D, Se transfectaron cardiomiocitos neonatales con RNAs modificados que expresaban SRSF3-GFP o GFP (usado para normalizar). Después de fijar con radiación ultravioleta (UV), se inmunoprecipitaron los complejos RNA-proteína usando un anticuerpo contra GFP y se analizó la presencia de los mRNAs de SERCA2A (A), TNNT2 (B), MYH6 (C) y TNNI3 (D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni. Nótese que los valores de GAPDH son los mismos en todas las gráficas.

La unión de SRSF3 a la zona 3' UTR no incrementa la estabilidad del mRNA

Basándonos en que estudios previos han descrito el posible papel de las proteínas SR en la regulación de la estabilidad de los mRNAs (Änkö, 2014), y en nuestros resultados que muestran que SRSF3 se une directamente a algunos de los genes de contracción, nos preguntamos si SRSF3 podría estar regulando la estabilidad de los mRNAs mediante su unión a la zona 3' UTR. Para probarlo, usamos un ensayo de estabilidad previamente descrito (Rambout *et al.*, 2016). En dicho ensayo se utiliza un sistema de unión proteína-RNA presente en el virus de MS2. Dicho virus produce la proteína llamada coat protein (CP), la cual modula la traducción de los RNAs virales mediante su unión a estructuras en forma de horquilla presentes en dichos RNAs. Aprovechando este sistema, se fusionaron 8 repeticiones de estas horquillas en la zona 3' de la luciferasa de *Renilla reniformis* (R-Luc), generando el plásmido Rluc8. Como control usamos la misma construcción, pero carente de dichas repeticiones (Rluc0). Estos plásmidos se co-transfectaron en células P19 junto con un plásmido de expresión de MS2-CP o MS2-CP-SRSF3, donde fusionamos SRSF3 en la zona 3' de MS2-CP, forzando así la unión de SRSF3 al transcrito que contenga las horquillas de unión de MS2-CP (Figura 18A). Tras la transfección analizamos la cantidad de R-Luc que permanece estable a lo largo del tiempo tras tratar con actinomicina D (ActD). La ActD inhibe la transcripción, evitando así la formación de mRNAs nuevos.

Los resultados mostraron que la unión de SRSF3 a la zona 3' del mRNA no influye en su estabilidad (Figura 18B, C) ni en la actividad de la proteína (Figura 18D, E). Esto sugiere que el mecanismo a través del cual los genes de contracción disminuyen su expresión tras la pérdida de SRSF3 es independiente a la estabilidad del transcrito mediada por la unión de la RBP a la zona 3' UTR.

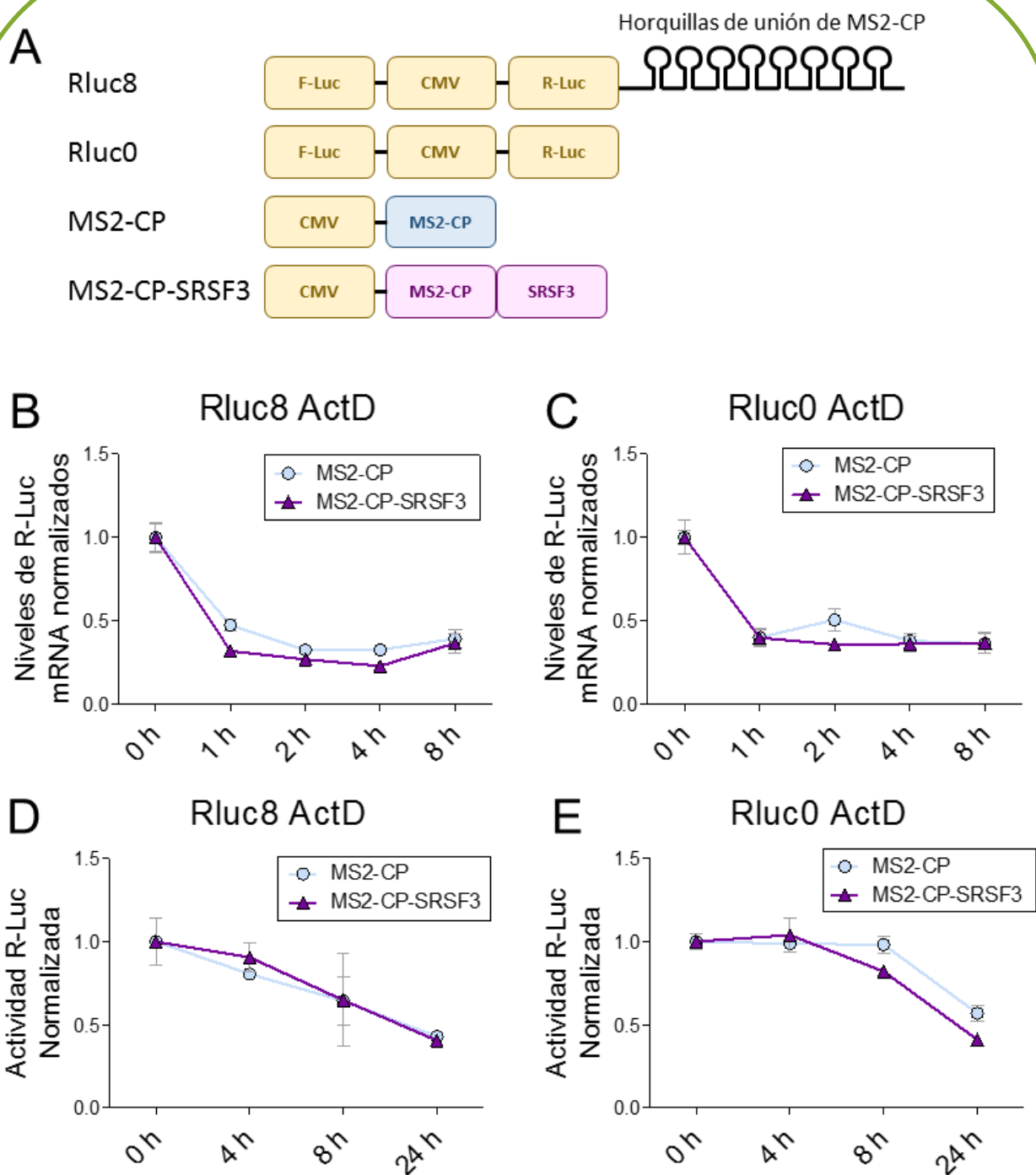


Figura 18. La unión de SRSF3 a la zona 3' UTR no incrementa la estabilidad del mRNA.

A, Esquema de los plásmidos utilizados en el ensayo de estabilidad del mRNA. **B-E**, Células P19 se transfectaron con los plásmidos MS2-CP o MS2-CP-SRSF3 y Rluc8 o Rluc0. Rluc8 contiene 8 repeticiones de la horquilla de unión de la proteína MS2-CP en la zona 3' de R-Luc, mientras que Rluc0 no contiene dichas repeticiones (control). Tras la transfección se trataron las células con actinomicina D (ActD) y se cuantificó la cantidad de R-Luc que permanece estable a distintos tiempos tras el tratamiento. Se cuantificó tanto RNA por qRT-PCR (**B**, **C**) como actividad de la proteína (**D**, **E**). Los datos están representados como la media \pm SE. $n=3-5$ por grupo. ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni.

La pérdida de SRSF3 induce el proceso de NMD de forma tardía

Entre las múltiples funciones de las proteínas SR se encuentra la regulación del splicing, tanto constitutivo como alternativo (Änkö, 2014). En concreto, se ha descrito que SRSF3 interviene en la inclusión de exones alternativos que provocan la incorporación de stop codons prematuros, desencadenando la degradación del mRNA por el proceso de non-sense mediated decay (Änkö *et al.*, 2012). Basándonos en estos resultados, decidimos comprobar si este proceso estaba afectado también en nuestros ratones SRSF3 KO.

El análisis por qRT-PCR de genes implicados en el proceso de NMD reveló que hay una subida en la expresión de dichos genes en los corazones de los ratones que carecen de la expresión de SRSF3 (Figura 19A-E). También observamos un aumento en la expresión de la isoforma de SERCA2A que sufre el proceso de degradación por NMD (Figura 19F). Sin embargo, las inducciones mencionadas ocurren en días tardíos tras la última inyección de tamoxifeno, en ningún caso se observan diferencias antes de día 4. De estos resultados podemos concluir que la falta de SRSF3 en el corazón induce el proceso de NMD, aunque éste no es el mecanismo a través del cual ocurre la pérdida tan prematura de la expresión de los genes de contracción.

SRSF3 interactúa con LSM14A e interfiere en el proceso de decapping

Para elucidar el mecanismo de acción de SRSF3, realizamos inmunoprecipitación (IP) de SRSF3-GFP y GFP aislados de cardiomiocitos neonatales previamente transfectados con los respectivos modRNAs. Posteriormente se realizó un análisis de proteómica cuantitativo para detectar las proteínas que interaccionan con SRSF3. Entre las proteínas que sólo aparecían en la condición de SRSF3, se encuentra LSM14A (Figura 20A y Tabla Suplementaria 2). Para validar dicha interacción se repitió la misma IP y se analizó por western blot la

presencia de LSM14A. A falta de confirmación, los resultados sugieren que SRSF3 interacciona con LSM14A (Figura 20B).

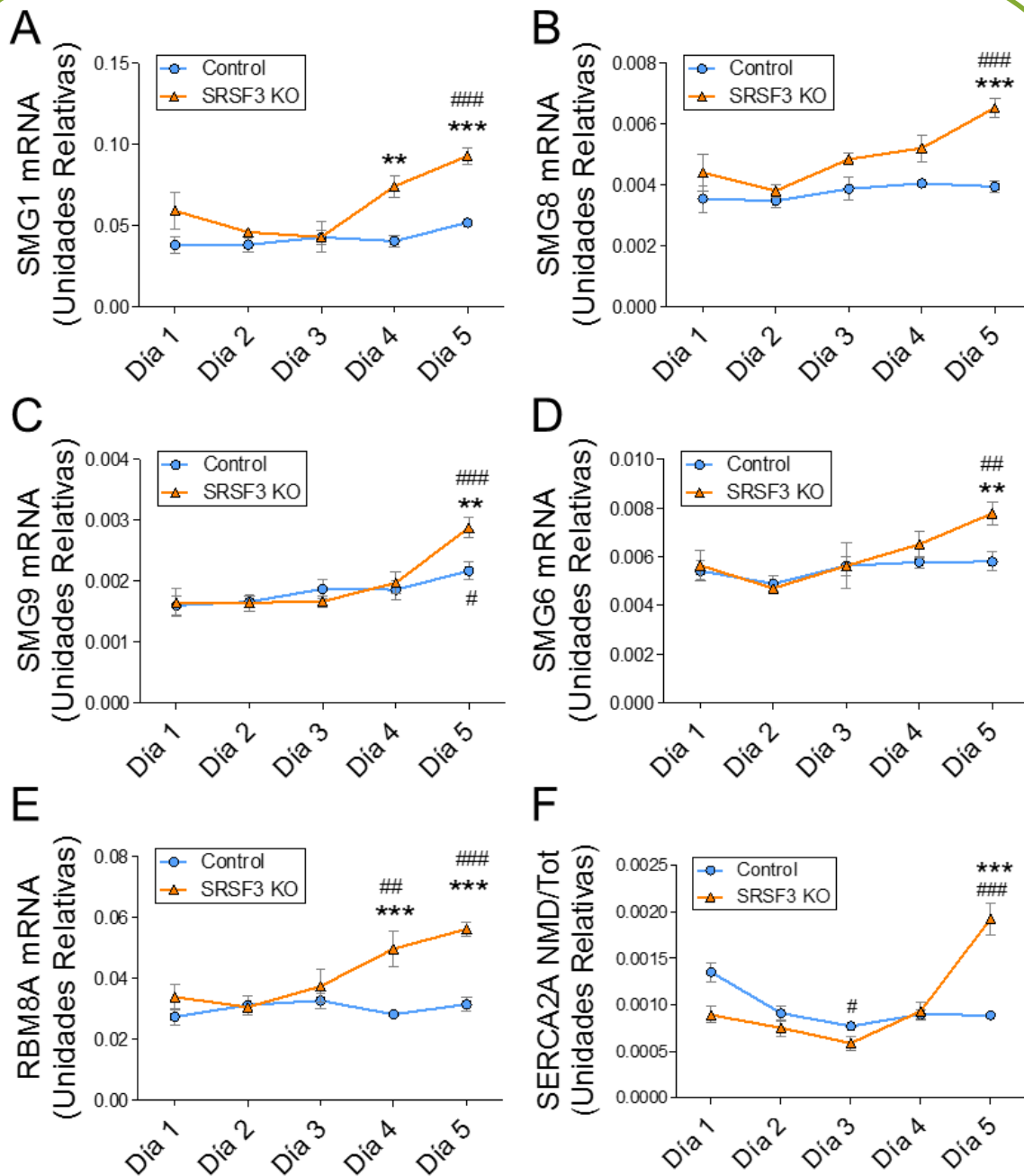


Figura 19. En los ratones SRSF3 KO se induce el proceso de NMD de forma tardía. A-E, La expresión cardíaca de SMG1 (A), SMG8 (B), SMG9 (C), SMG6 (D) y RBM8A (E) fue cuantificada por qRT-PCR varios días tras la inducción de la recombinación. **F,** La isoforma de NMD de SERCA2A se cuantificó por qRT-PCR en los corazones a distintos tiempos tras la última inyección de tamoxifeno y se normalizó contra la expresión total de SERCA2A. Los datos están representados como la media \pm SE. $n=5-13$ ratones por grupo. $**p<0.01$, $***p<0.001$ SRSF3 KO vs Control. $\#p<0.01$, $\#\#p<0.001$ vs Día 1. ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni.

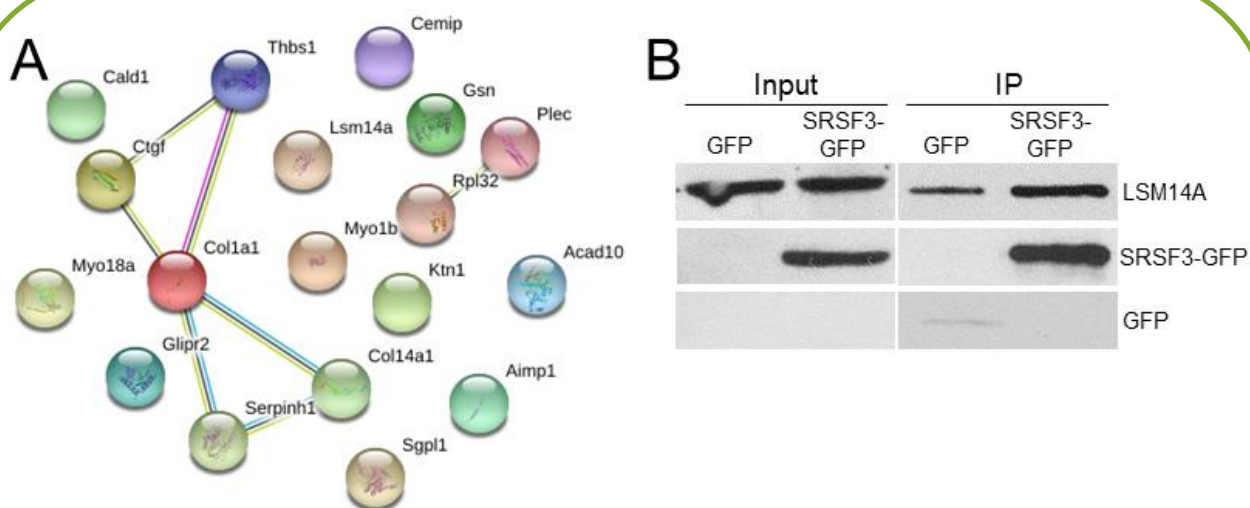


Figure 20. SRSF3 interactúa con LSM14A. **A**, Representación de las proteínas que interaccionan con SRSF3-GFP en cardiomiocitos neonatales. Se realizó una inmunoprecipitación de SRSF3-GFP o GFP (como control) y se llevó a cabo un análisis de proteómica cuantitativo de las proteínas precipitadas. Se han representado las proteínas que solo aparecen interactuando con SRSF3-GFP, usando String. **B**, Se inmunoprecipitó SRSF3-GFP o GFP desde cardiomiocitos neonatales previamente transfectados y se detectó la presencia de LSM14A por western blot.

Mediante su interacción con DCP2, LSM14A promueve la eliminación del cap de los mRNAs (Fromm *et al.*, 2012). Este proceso denominado decapping, desencadena la degradación del correspondiente mRNA (Li and Kiledjian, 2010). Dada su interacción con SRSF3, decidimos comprobar si el proceso de decapping estaba afectado en los ratones SRSF3 KO. Para ello, cuantificamos la proporción de mRNA decapped con respecto al mRNA total de los genes de contracción cuya expresión baja tras la pérdida de SRSF3. Como resultado observamos que hay un incremento de mRNAs decapped en los ratones SRSF3 KO comparado con los controles para los genes SERCA2A, RyR2, MYBPC3 y MYH7. Aunque el mayor incremento se observa a día 5 tras la inducción, ya se encuentra alguna diferencia a día 2 (Figura 21).

Estos resultados indican que la bajada de expresión de los genes de contracción tras la depleción de SRSF3 puede ser consecuencia de un incremento en el proceso de decapping. La interacción de SRSF3 con LSM14A podría estar influyendo en este proceso, promoviéndolo ante la ausencia de SRSF3.

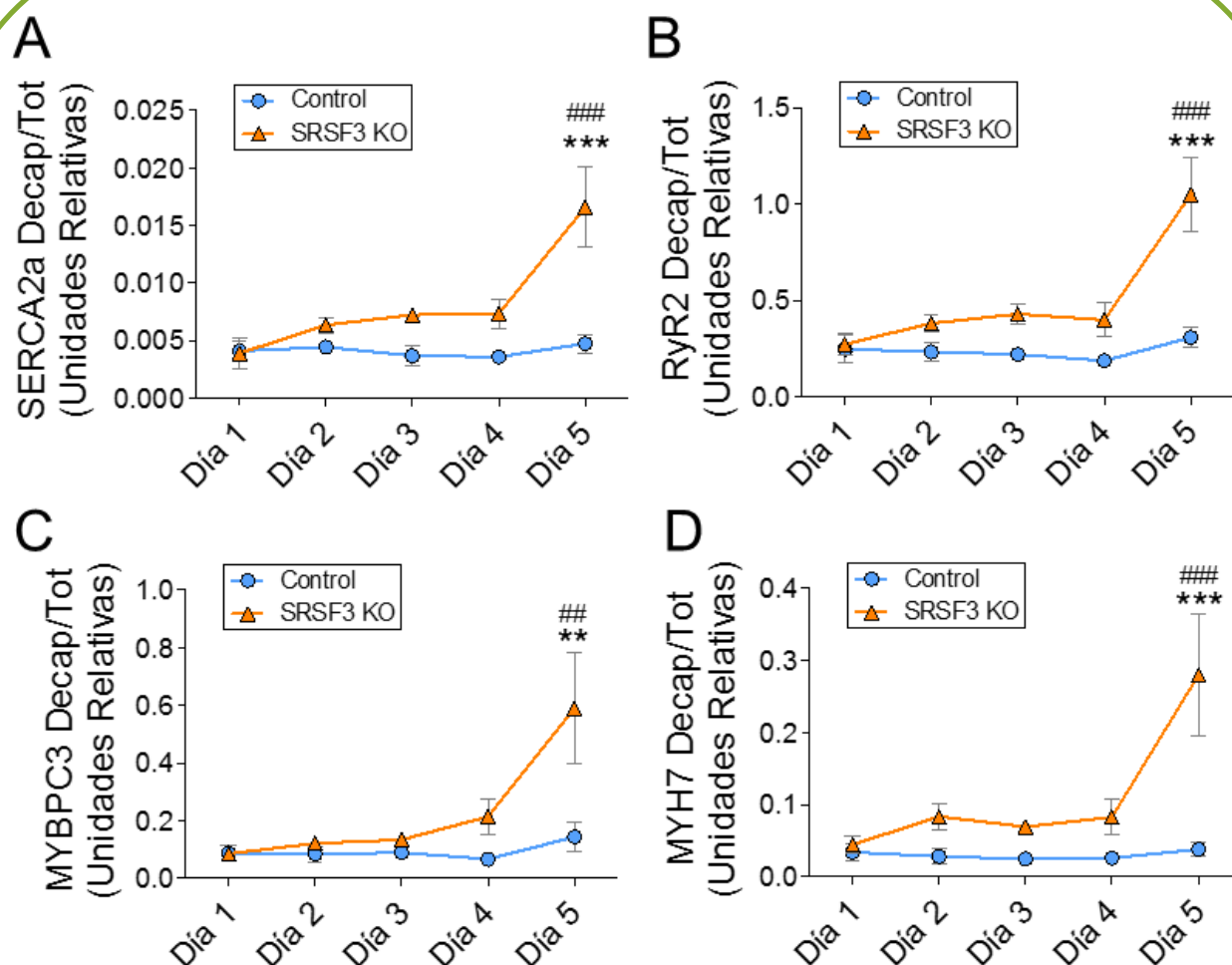


Figura 21. La pérdida expresión de SRSF3 induce el proceso de decapping en los genes de contracción. A-D, La expresión cardíaca de los mRNAs decapped de SERCA2A (A), RyR2 (B), MYBPC3 (C) y MYH7 (D) fue cuantificada por qRT-PCR varios días tras la última inyección de tamoxifeno y normalizada contra la expresión del mRNA total correspondiente. Los datos están representados como la media \pm SE. $n=5-9$ ratones por grupo. $**p<0.01$, $***p<0.001$ SRSF3 KO vs Control. $**p<0.01$, $***p<0.001$ vs Día 1. ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni.

La sobreexpresión de SERCA2A rescata parcialmente el fenotipo de los ratones SRSF3 KO

Una estrategia muy utilizada en los últimos años como terapia en las enfermedades cardiovasculares es el uso de virus adeno-asociados (AAV) expresando genes que ayuden a la mejora de la función cardíaca y limiten la progresión de la enfermedad. El éxito de los AAVs se basa en su mínima inmunogenicidad, en que son vectores no integrativos y en su capacidad de infección de células tanto si se encuentran en división como si no (Hammoudi, Ishikawa and Hajjar, 2015; De Bruin *et al.*, 2017). En estudios previos se ha estudiado SERCA2A como diana terapéutica para tratar la insuficiencia cardíaca (Lipskaia *et al.*, 2010). Se ha probado que su expresión mejora la función cardíaca en varios modelos animales (del Monte *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2008; Kawase and Hajjar, 2008). Dado que SERCA2A es uno de los genes que sufren una bajada mayor y más temprana tras la depleción de SRSF3, decidimos investigar si sobreexpresando SERCA2A en los ratones SRSF3 KO podíamos rescatar el fenotipo y mejorar la contracción del corazón.

Para abordar esta hipótesis, generamos un virus adeno-asociado de serotipo 9 (AAV9) que expresa SERCA2A (AAV-SERCA2A). Inyectamos el virus por vía intravenosa a través de la vena femoral en ratones SRSF3 KO una semana antes de la administración de tamoxifeno. De esta forma, el virus ya se estaría expresando SERCA2A en el momento en que los ratones pierdan la expresión de la proteína endógena (Figura 22A). Comprobamos la sobreexpresión de SERCA2A por western blot 5 días después de la inducción de la recombinación con tamoxifeno y observamos una clara sobreexpresión de la proteína, superando los niveles de expresión endógenos de los ratones control (Figura 22B).

Tal y como hicimos para caracterizar el fenotipo de los ratones SRSF3 KO, evaluamos la función cardíaca de estos ratones por ecocardiografía 5 días después de la inducción. El análisis mostró que, aunque se puede observar una ligera tendencia de mejora de la fracción de eyección del VI, no existe un incremento significativo en los ratones que habían recibido el virus (Figura 22C). Sin embargo, a nivel molecular pudimos observar que la expresión del marcador de disfunción

cardiaca BNP se encuentra reducida en los ratones sobreexpresantes de SERCA2A, comparado con los ratones que no recibieron virus (Figura 22D). De estos resultados podemos concluir que la sobreexpresión de SERCA2A solo rescata el fenotipo de los ratones SRSF3 KO de forma parcial. Lo razón más probable de que la mejora sea tan pequeña es que no se está corrigiendo la pérdida de expresión de los otros genes implicados en la contracción cardiaca.

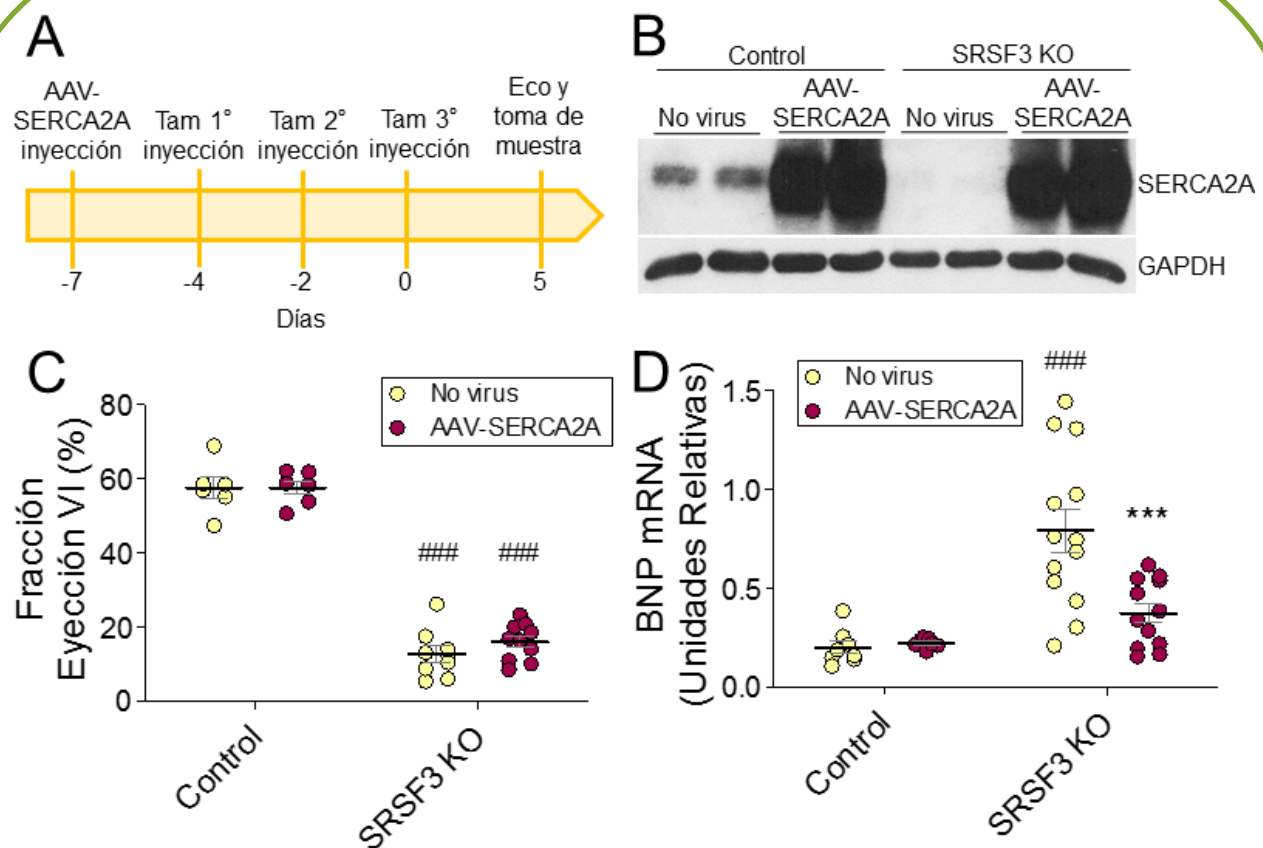


Figura 22. La sobreexpresión de SERCA2A rescata parcialmente el fenotipo de los ratones SRSF3 KO. **A**, El virus adeno-asociado serotipo 9 que expresa el gen SERCA2A (AAV-SERCA2A) se inyectó 7 días antes de la administración de tamoxifeno (Tam). El fenotipo cardiaco se analizó por ecocardiografía (Eco) 5 días tras la última inyección de tamoxifeno. **B**, La expresión proteica de SERCA2A en el corazón se detectó por western blot. **C**, La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (VI) se cuantificó por ecocardiografía. **D**, La expresión de BNP en el corazón se cuantificó por qRT-PCR. *** $p < 0.001$ AAV-SERCA2A vs No Virus. ### $p < 0.001$ SRSF3 KO vs Control. ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni. Hay que tener en cuenta que los animales "No virus" utilizados para este análisis son los mismos mostrados en las Figuras 12 y 13, y se repiten aquí con fines comparativos.

Caracterización de la sobreexpresión de SRSF3 en el infarto de miocardio

La sobreexpresión de SRSF3 mejora la función cardíaca tras el infarto de miocardio

Con el objetivo de estudiar el efecto de una sobreexpresión moderada de SRSF3 en el corazón infartado, generamos un AAV9 que expresa SRSF3 (AAV-SRSF3). Administramos el virus a través de la vena femoral a ratones C57BL/6, los operamos una semana después para inducir MI mediante la ligación permanente de la arteria coronaria, y analizamos la función cardíaca por ecocardiografía 2 y 28 días tras la cirugía (Figura 23A). Comprobamos la expresión de SRSF3 28 días tras la cirugía en el miocardio remoto y observamos una moderada pero significativa sobreexpresión (Figura 23B).

El análisis ecocardiográfico mostró que 28 días después del infarto de miocardio, los ratones que sobreexpresan SRSF3 presentan una mayor fracción de eyección y una reducción del volumen diastólico del VI, comparado con los ratones control que recibieron suero en lugar de virus (Figura 23C, D). Estos resultados muestran que la bajada de expresión de SRSF3 observada tras MI es parcialmente responsable del empeoramiento en la función cardíaca.

Tras el infarto de miocardio baja la expresión de genes de contracción y aumenta su decapping

Teniendo en cuenta nuestros resultados previos, decidimos estudiar si tras un MI también había un cambio en el decapping de los genes relacionados con la contracción. Mediante qRT-PCR, observamos que tanto SERCA2A como RyR2 bajan su expresión después de MI en la zona remota en ratones C57BL/6 (Figura 24A, B), coincidiendo con resultados anteriormente descritos (Sallinen *et al.*, 2007; Lipskaia *et al.*, 2010). Curiosamente, encontramos un aumento en la proporción de estos

mRNAs que pierden la estructura cap (Figura 24C-D), tal y como hemos observado previamente en los ratones SRSF3 KO (Figura 21).

Nuestros resultados sugieren que el empeoramiento de la función cardíaca que ocurre tras MI es en parte consecuencia de la bajada de expresión de SRSF3. Probablemente, este empeoramiento se deba a la reducción en la expresión de los genes implicados en la contracción, causada por un aumento del decapping que conlleva la degradación de los mRNAs (Li and Kiledjian, 2010).

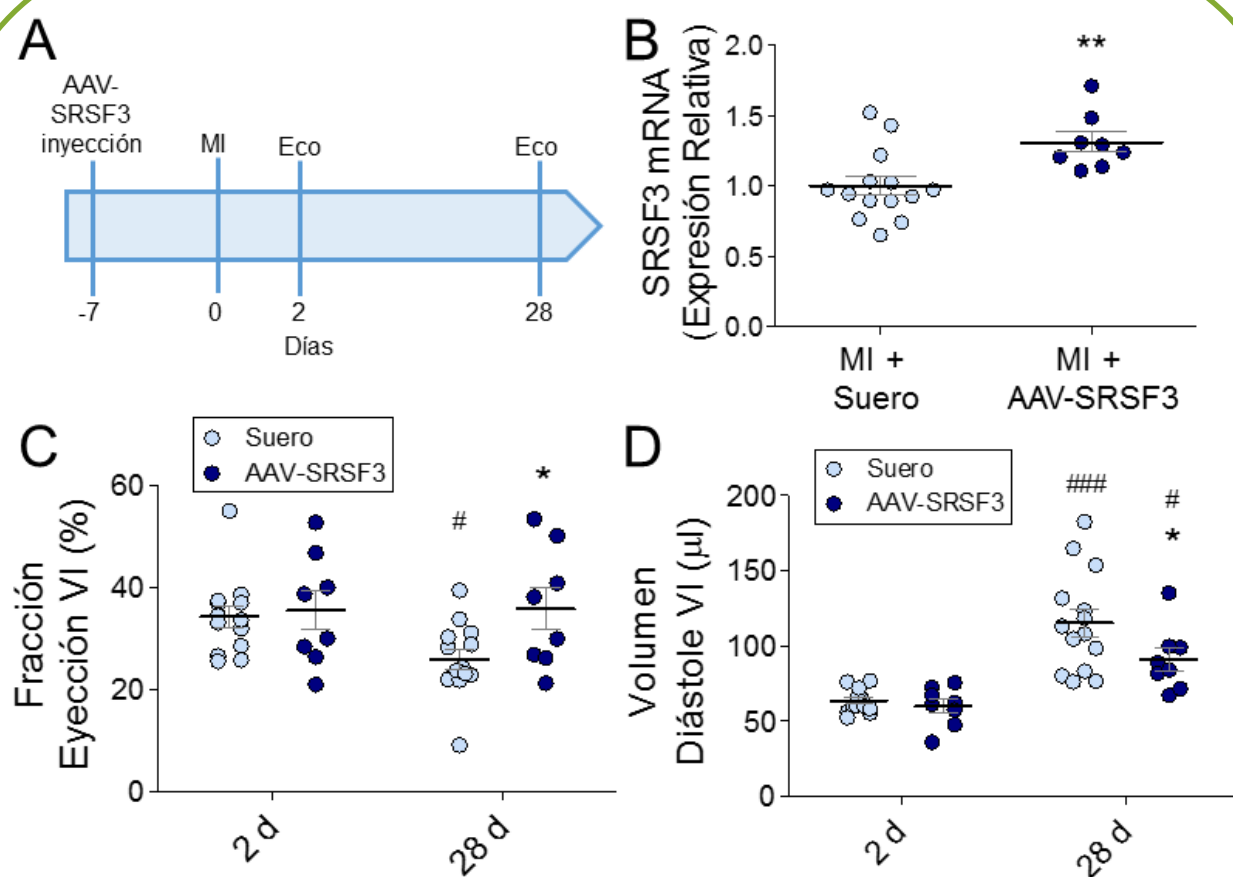


Figura 23. La sobreexpresión de SRSF3 mejora la función cardíaca tras el infarto de miocardio. **A**, Se inyectó el virus adeno-asociado serotipo 9 que expresa el gen SRSF3 (AAV-SRSF3) o suero 7 días antes del infarto de miocardio (MI) en ratones C57BL/6. La función cardíaca fue analizada por ecocardiografía (Eco) 2 y 28 días tras el MI. **B**, La expresión de SRSF3 en el miocardio remoto tras MI fue analizada por qRT-PCR. ** $p < 0.01$. T-test. **C-D**, La fracción de eyección (C) y el volumen diastólico (D) del ventrículo izquierdo (VI) fueron cuantificados por ecocardiografía. * $p < 0.05$ AAV-SRSF3 vs Suero. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ 28 d vs 2 d. ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni.

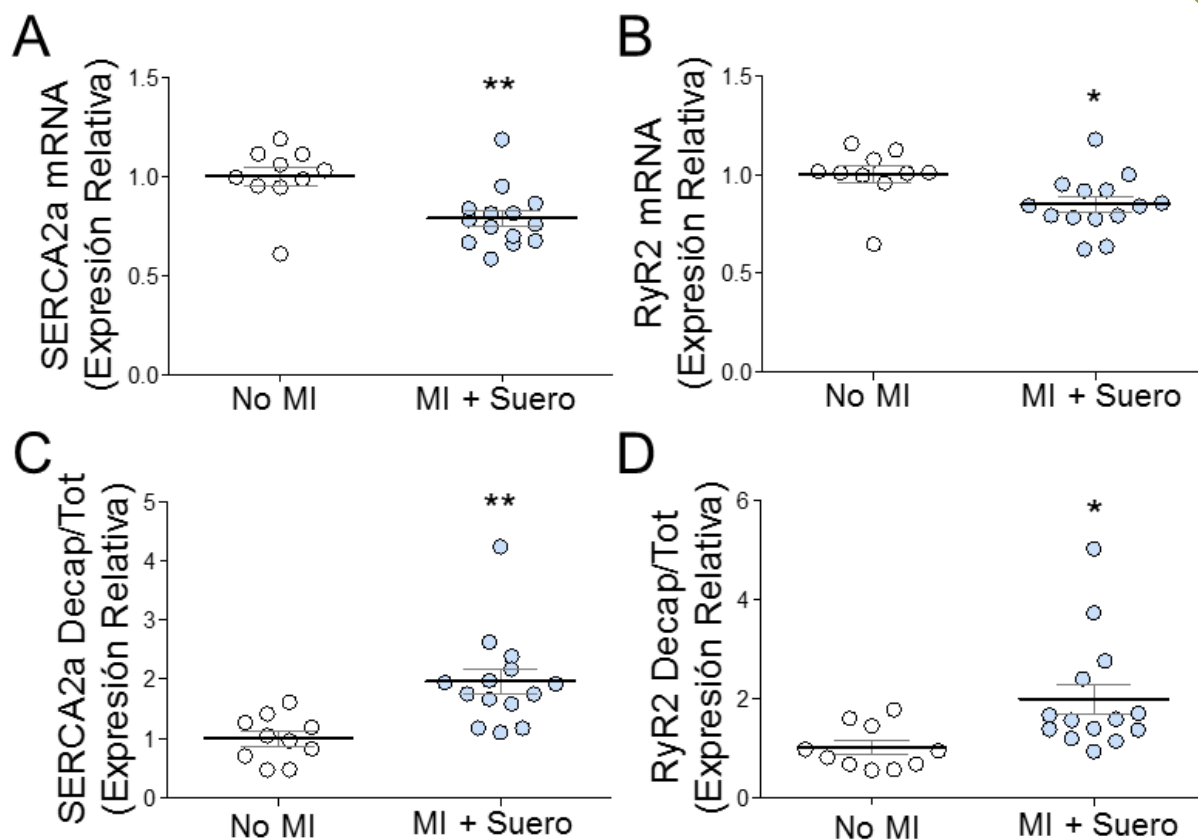


Figura 24. Tras el infarto de miocardio baja la expresión de genes de contracción y aumenta su decapping. A-B, La expresión de SERCA2A (A) y RyR2 (B) en la región remota tras infarto de miocardio (MI) y en corazones control sin infarto se cuantificó por qRT-PCR. **C-D,** La expresión de los mRNAs decapped de SERCA2A (C) y RyR2 (D) fue cuantificada por qRT-PCR en el miocardio remoto tras MI y en corazones control y normalizada contra la expresión del mRNA total correspondiente. *p<0.05, **p<0.01. T-test.

DISCUSIÓN

La pérdida de SRSF3 en el corazón causa un fenotipo más agresivo en comparación con la de otras proteínas SR

En comparación con las otras proteínas SR cuyo papel ha sido estudiado en el corazón, la depleción de SRSF3 es la que presenta un fenotipo más agresivo. Tanto la depleción constitutiva y ubicua de SRSF1, SRSF2, SRSF10 como la de SRSF3 resultan letales en estadios embrionarios (Jumaa, Wei and Nielsen, 1999; Wang *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2009). En el caso de la depleción de SRSF10, los ratones desarrollan un fenotipo cardiaco patológico y la mayoría de los ratones mueren durante el desarrollo debido a múltiples defectos en la formación del corazón (Feng *et al.*, 2009). Sin embargo, la eliminación cardio-específica de SRSF1 y SRSF2 no parece tener el mismo efecto, ya que en ambos casos las camadas de ratones cumplen con la proporción mendeliana esperada (Ding *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005). Mientras que tal y como muestran nuestros resultados, la pérdida de SRSF3 en el corazón desde el desarrollo resulta letal para los embriones. La baja expresión de SRSF3 en los cardiomiocitos adultos correlaciona con estudios previos que lo describen como un proto-oncogen (Jia *et al.*, 2010; He *et al.*, 2011; Kurokawa *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2017, 2018), ya que estas células sufren parada del ciclo celular y no se dividen. Por el contrario, la proliferación celular de los cardiomiocitos durante el desarrollo embrionario es crucial para la correcta formación del corazón. De acuerdo con estos estudios, la razón de la letalidad embrionaria causada por la falta de expresión de SRSF3 en cardiomiocitos podría deberse a una falta de proliferación de estas células y el consecuente fallo en la formación del corazón. Resultaría interesante analizar los defectos que aparecen en los corazones en desarrollo ante la falta de SRSF3 e investigar si hay una reducción en la proliferación de los cardiomiocitos, además de determinar el estadio embrionario en el que mueren estos embriones.

Así mismo, su pérdida en el corazón adulto causa un fenotipo muy severo. Tras inducir la recombinación del gen de SRSF3 en corazones de ratones adultos, éstos apenas son capaces de sobrevivir una semana. La pérdida cardiaca de SRSF1 también resulta letal para los animales, pero a diferencia de nuestro modelo, los ratones no empiezan a morir hasta 6-8 semanas tras el parto (Xu *et al.*, 2005), mientras que la eliminación cardiaca de SRSF2 no tiene efecto sobre la esperanza de vida de los animales (Ding *et al.*, 2004). Los fenotipos causados por la pérdida de estas tres proteínas también difieren mucho. En el KO de SRSF3 observamos una falta de contracción, pero a diferencia del KO de SRSF2, el corazón no se dilata y no se llega a producir cardiomiopatía dilatada (Ding *et al.*, 2004). Los ratones KO de SRSF1 muestran un fenotipo opuesto, donde los cardiomiocitos desarrollan hipercontracción (Xu *et al.*, 2005).

De acuerdo a la variedad en los fenotipos cardiacos de las distintas proteínas SR, sus dianas y mecanismos de acción también son distintos. Los fenotipos causados por la pérdida de SRSF1, SRSF2 o SRSF10 parecen estar causados por un determinado RNA, mientras que las dianas cardiacas de SRSF3 son más variadas. SRSF1 afecta al splicing de CaMKII δ , la pérdida de SRSF2 reduce los niveles de expresión de RyR2 y SRSF10 afecta al splicing de triadina reduciendo sus niveles de expresión y los de calsequestrina (CASQ2) (Ding *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2009). En comparación, tras el knockout de SRSF3, multitud de genes implicados en la contracción cardiaca disminuyen su expresión. La recuperación de los niveles de expresión de uno de ellos, SERCA2A, no es capaz de revertir por completo el fenotipo causado por la pérdida de SRSF3, lo que sugiere que el fenotipo observado en los ratones SRSF3 KO es resultado de la reducción conjunta de la expresión de varios genes.

En resumen, nuestros datos y los estudios previamente mencionados demuestran que las funciones de las proteínas SR en el corazón no son redundantes, ya que su eliminación causa fenotipos patológicos distintos. En particular, la función de SRSF3 en el corazón adulto parece ser única ya que ningún otro factor es capaz de suplir su función y evitar la muerte tan prematura de los animales.

Comparación del fenotipo cardiaco de SRSF3 con el de otros tejidos

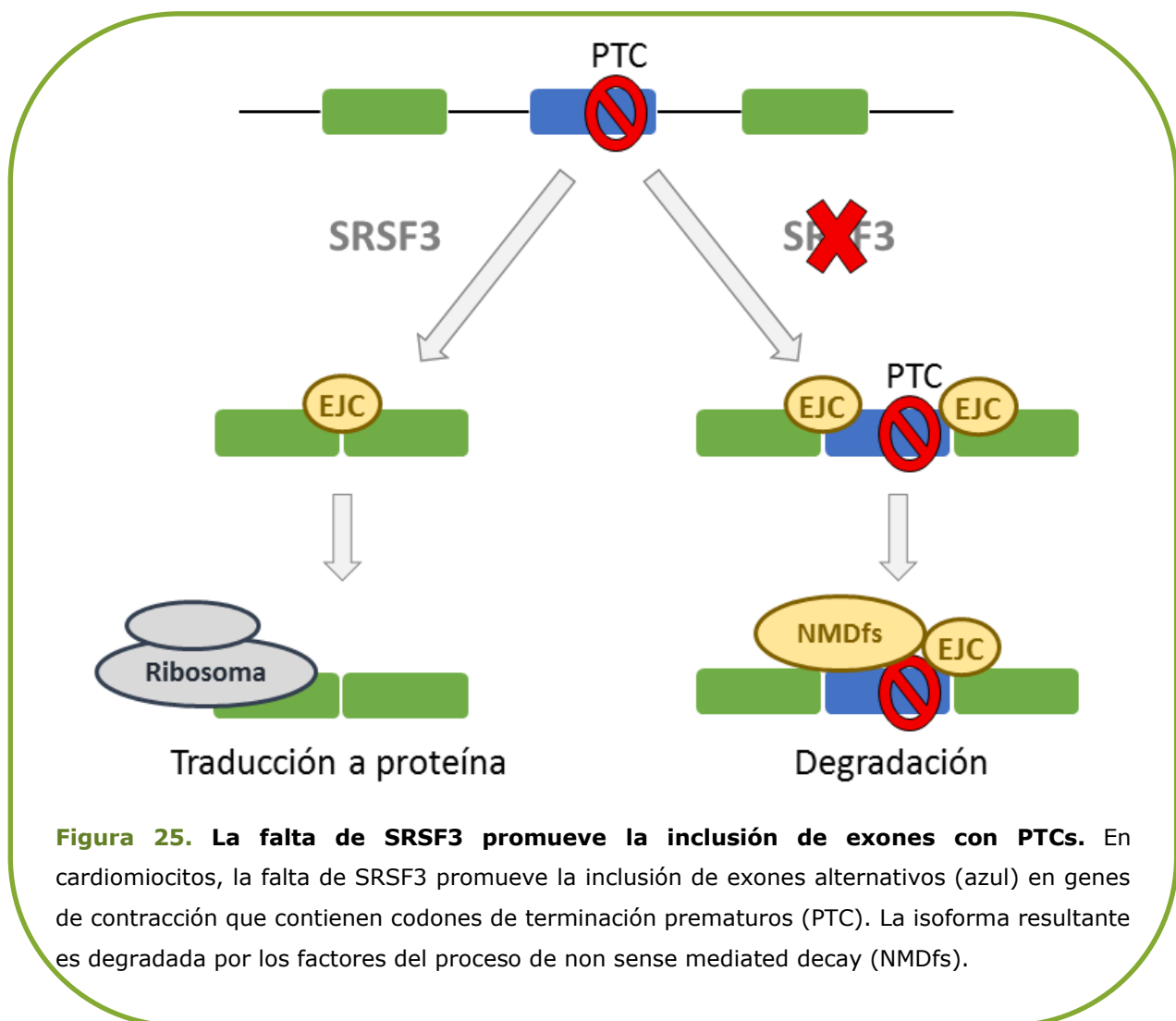
El papel desempeñado por SRSF3 en otros órganos no parece ser tan esencial para la supervivencia de los ratones como lo es en corazón. La falta de expresión de SRSF3 específicamente en hepatocitos afecta a la maduración y la función del hígado, lo cual se traduce en un retraso del crecimiento normal de los animales. Sin embargo, las camadas se obtienen con las proporciones mendelianas esperadas y la esperanza de vida de estos ratones no se ve afectada (Sen, Jumaa and Webster, 2013). Esto sugiere que SRSF3 es fundamental para la correcta formación y función tanto del corazón como del hígado, pero que el papel que desempeña en cada uno de ellos es distinto. También indica que su expresión en distintos órganos no es igual de necesaria para la vida de los animales, siendo su función en el corazón la más importante demostrada hasta ahora.

Estudios previos definen a SRSF3 como un proto-oncogen que promueve la proliferación celular (Jia *et al.*, 2010; He *et al.*, 2011; Kurokawa *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2017, 2018). Sin embargo, dos estudios contradicen el papel de proto-oncogen de SRSF3. Los ratones carentes de la expresión de SRSF3 en hepatocitos acaban desarrollando hepatocarcinomas con la edad. Además, la expresión de SRSF3 también se encuentra reducida en tejidos cancerígenos de hígados humanos (Sen *et al.*, 2015). Por otra parte, S. Kano *et al.* han demostrado que es la isoforma de la proteína truncada de SRSF3 la que promueve la transición de una fase del ciclo celular a otra (G1 a S) y por consiguiente la proliferación celular (Kano *et al.*, 2013). Todos estos resultados sugieren que la función de SRSF3 varía en función del tejido en el que se esté expresando, pudiendo ejercer incluso funciones contrarias, actuando como proto-oncogen o como supresor de tumores dependiendo del tipo celular y de la isoforma de la proteína que se expresa.

SRSF3 interviene en la degradación de los mRNAs

La mayoría de los estudios sobre SRSF3 se han centrado en su papel como factor regulador de splicing y en los cambios de isoformas que produce, relacionándolos con enfermedades como el cáncer. Sin embargo, la función

reguladora de splicing de este factor en el corazón parece desempeñar un papel secundario. En este texto hemos demostrado que ante la falta de SRSF3 en cardiomiocitos se producen cambios de splicing en los genes de contracción, donde se promueve la inclusión de exones que provocan la aparición de isoformas que se degradan por el proceso de NMD (Figura 25). Pero este mecanismo no parece ser la causa de la muerte de los animales ya que se produce varios días tras la inducción de la recombinación de SRSF3, mientras que los mRNAs de los genes implicados en la contracción cardiaca sufren la bajada de expresión en los primeros días tras dicha recombinación.



El efecto más llamativo ante la eliminación de SRSF3 en el corazón es la cantidad de genes cuya expresión se ve reducida a nivel de RNA. Ante este hecho y estudios previos que demuestran la implicación de proteínas SR en la prolongación de la vida media de los mRNAs de forma independiente al splicing (Lemaire *et al.*, 2002), nos planteamos la posibilidad de que SRSF3 estuviera implicado en la prolongación de la vida media de los mRNA mediante su unión al 3' UTR. Sin embargo, tal y como se ha expuesto en los resultados, este no parece ser el caso, ya que la unión de SRSF3 al extremo 3' UTR de un mRNA no lo hace más estable.

En su lugar, el principal mecanismo de acción en los cardiomiocitos reside en la regulación de la degradación de los mRNAs independiente de cambios en splicing. Nuestros resultados muestran una inducción temprana en la pérdida de la estructura cap en los mRNAs de los genes implicados en la contracción cardiaca, sugiriendo que ésta es la causa por la que se produce la bajada de expresión tan drástica de estos genes ante la ausencia de SRSF3 (Figura 26).

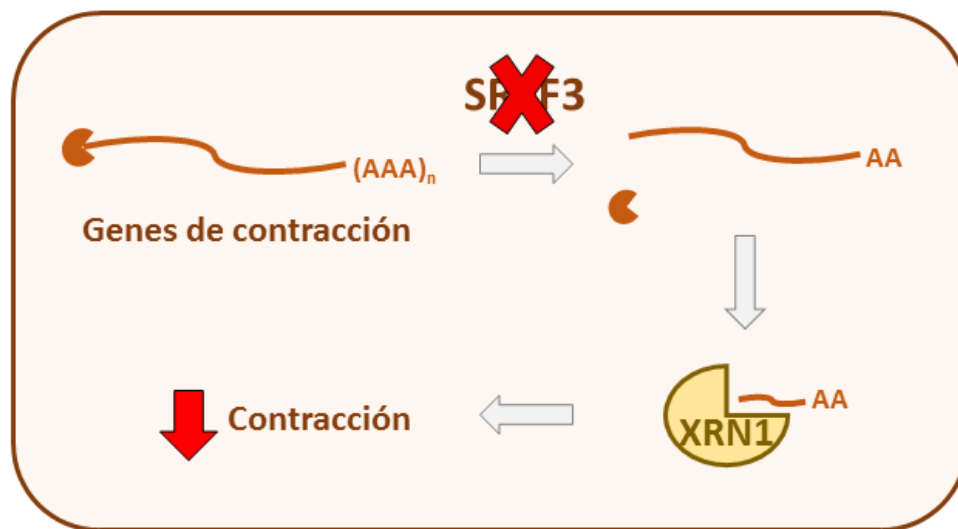


Figura 26. La pérdida de SRSF3 en cardiomiocitos induce el decapping. Tras la depleción de SRSF3 en cardiomiocitos, se produce un aumento de los mRNAs de los genes de contracción que carecen del cap. Como consecuencia, estos mRNAs se degradan dando lugar a problemas de contracción.

Además, los resultados del análisis de proteómica indican que SRSF3 interactúa con LSM14A, cuya implicación en el proceso de decapping ha sido descrita previamente (Fromm *et al.*, 2012). La pérdida del cap constituye el primer paso en la ruta de degradación 5'-3' de los mRNAs, tras la cual se procede a la completa eliminación del mRNA (Houseley and Tollervey, 2009). El decapping se produce por acción del complejo DCP1-DCP2, donde DCP2 constituye la enzima catalítica que lleva a cabo la eliminación del cap (Fromm *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). La interacción de DCP2 con diversas proteínas influye en la actividad catalítica de dicha enzima. Entre estas proteínas que interactúan con DCP2 se encuentra LSM14A. En el estudio llevado a cabo por S. Fromm *et al.* se demuestra que la interacción de LSM14A con DCP2 promueve su actividad catalítica y la consecuente inducción del proceso de decapping (Fromm *et al.*, 2012). En base a estos estudios y los resultados obtenidos en esta tesis, podemos especular que la interacción de SRSF3 con LSM14A podría influir en su capacidad de interacción y/o activación de DCP2. De esta forma, cuando SRSF3 está ausente, LSM14A promovería la actividad catalítica de DCP2. En base a esta hipótesis sería interesante estudiar las variaciones en la interacción de LSM14A y DCP2 en presencia o ausencia de SRSF3.

Los experimentos de inmunoprecipitación de células cross-linkeadas (CLIP) realizados hasta ahora para SRSF3 se han hecho en células en cultivo, en concreto en P19. En el primer CLIP se rompió el dogma implantado hasta entonces de que las proteínas SR se unen principalmente a motivos localizados en exones y demostraron que existe un enriquecimiento de motivos a lo largo de todo el mRNA, incluidas las regiones no traducidas (3' y 5' UTR) e incluso los intrones (Änkö *et al.*, 2012). En el estudio llevado a cabo por M. Müller-McNicoll *et al.* se corroboró la acción de SRSF3 al margen del splicing y la importancia de su unión a regiones fuera de los exones para estas funciones (Müller-McNicoll *et al.*, 2016). Este estudio también ha revelado el papel de SRSF3 en la determinación de la longitud del extremo 3' UTR. Se ha demostrado que la bajada de expresión de SRSF3 provoca un acortamiento de esta región, lo cual los autores relacionan con el déficit de transporte al citoplasma que observan ante dicha bajada (Müller-McNicoll *et al.*, 2016). Pero este hecho puede estar también implicado en la degradación de los

mRNAs, ya que el acortamiento de la región 3' UTR es un inductor del decapping y la degradación del mRNA (Houseley and Tollervey, 2009).

Los dos estudios de CLIP demuestran que el motivo de unión de SRSF3 se encuentra bastante conservado en todas las regiones a las que se une esta proteína (Änkö *et al.*, 2012; Müller-McNicoll *et al.*, 2016). Sin embargo, ambos estudios están hechos en el mismo tipo celular. Sería interesante estudiar si este motivo de unión se conserva en otros tipos celulares y si, al igual que en las células P19, dicho motivo se encuentra distribuido a lo largo de toda la secuencia del mRNA o si por el contrario se encuentra enriquecido en alguna región en concreto en determinados tipos celulares. En el caso concreto de los cardiomiocitos, dado que nuestros resultados muestran una unión de SRSF3 a los mRNAs de los genes implicados en la contracción cardíaca, sería interesante estudiar si dicha unión se produce en las regiones 5' UTR, lo cual constituiría un argumento más a favor de su implicación en el proceso de decapping propuesto en este texto, ya que es en esta región en la que se encuentra la estructura de cap y donde actúa el complejo DCP1-DCP2.

La expresión de SRSF3 regula parcialmente la función cardíaca post-infarto

El primer estudio que relacionó SRSF3 con un posible papel en enfermedades cardiovasculares se publicó en 2012 por E. Anderson *et al.* En él estudiaban el efecto de la digitoxina sobre células humanas 293T. La digitoxina constituye un tipo de esteroide cardiotónico que se utiliza en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Su efecto terapéutico se basa en el bloqueo de la bomba de Na^+/K^+ de la membrana plasmática, lo que altera las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares y promueve la contracción de los cardiomiocitos. En este estudio demuestran que ante el tratamiento con digitoxina se produce una bajada en la expresión de SRSF3 y una serie de cambios de splicing causados por dicha bajada (Anderson *et al.*, 2012). Estos resultados constituyen el primer indicio de que SRSF3 puede estar implicado en la regulación de la contracción de los cardiomiocitos y potencialmente en las enfermedades cardiovasculares.

Nuestros resultados muestran que se produce una bajada de expresión de SRSF3 en el miocardio remoto tras MI, lo que nos hizo preguntarnos si SRSF3 podría desempeñar un papel en el empeoramiento de la función cardíaca que ocurre tras un infarto de miocardio. Mediante el uso de la terapia génica observamos que los ratones sobrepresantes de SRSF3 mostraban una mejor función y menor remodelamiento tras MI, sugiriendo que la bajada de SRSF3 desempeña un papel en la enfermedad cardiovascular interviniendo parcialmente en el empeoramiento de la función cardíaca post-infarto (Figura 27A). Sin embargo, la bajada de SRSF3 no es el único cambio de expresión que ocurre tras un infarto, lo cual explica que la mejora de la función al sobreexpresar este factor no sea mayor. Resultaría interesante estudiar si SRSF3 podría ser utilizado como diana o herramienta terapéutica. Para ello, en primer lugar habría que comprobar si la inyección del virus en las horas posteriores a la obstrucción de la arteria coronaria también produce una mejora de función. Además, la práctica clínica habitual consiste en reperfundir la arteria obstruida con la intención de reducir la extensión del área de miocardio necrosada y reducir así el tamaño del infarto. Por tanto, sería interesante también comprobar si la mejora de función dependiente de SRSF3 se aplica también a modelos de isquemia-reperfusión.

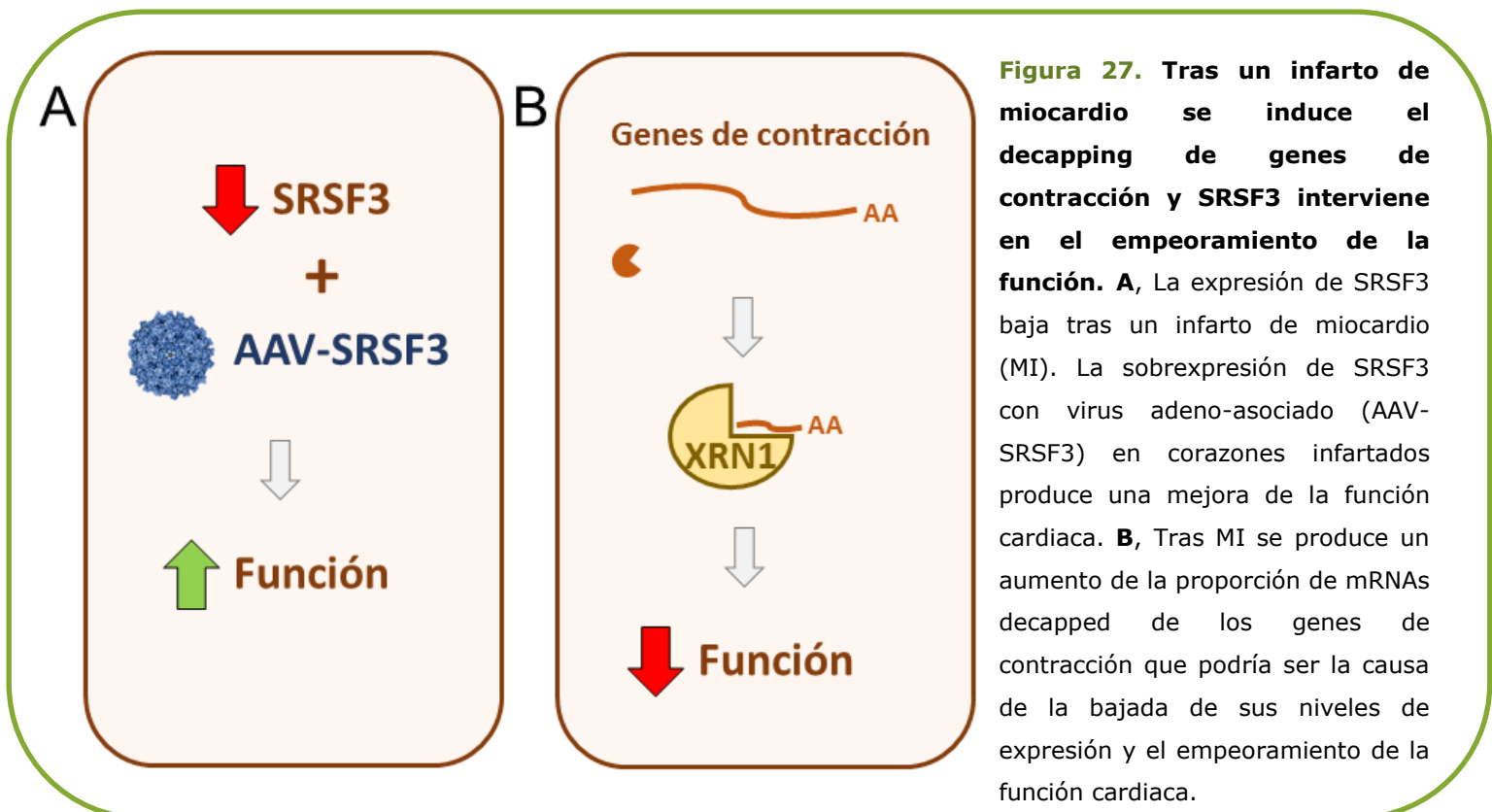


Figura 27. Tras un infarto de miocardio se induce el decapping de genes de contracción y SRSF3 interviene en el empeoramiento de la función. **A**, La expresión de SRSF3 baja tras un infarto de miocardio (MI). La sobreexpresión de SRSF3 con virus adeno-asociado (AAV-SRSF3) en corazones infartados produce una mejora de la función cardíaca. **B**, Tras MI se produce un aumento de la proporción de mRNAs decapped de los genes de contracción que podría ser la causa de la bajada de sus niveles de expresión y el empeoramiento de la función cardíaca.

Nuestros resultados no son la primera evidencia de la importancia de las RBPs en las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, se ha demostrado que la restauración de los niveles de expresión de RBFOX1 tras inducir hipertrofia en corazones mediante constricción de la aorta previene el desarrollo de la enfermedad (Gao *et al.*, 2016). Todos estos resultados remarcen la importancia de continuar caracterizando el papel que desempeñan las RBPs en el funcionamiento del corazón y cómo la manipulación de sus niveles de expresión nos puede ayudar a mejorar la función de corazones enfermos.

Tras un infarto de miocardio aumenta el decapping de genes de contracción

En este texto hemos descrito una serie de cambios moleculares que ocurren tras el MI que eran desconocidos hasta ahora. Previamente se había descrito la reducción en la expresión de genes implicados en la contracción, como RyR2 y SERCA2A, en el miocardio remoto tras un infarto (Sallinen *et al.*, 2007; Lipskaia *et al.*, 2010). Nosotros hemos corroborado esta bajada y además hemos probado que se produce un aumento en la proporción de transcritos de estos genes que han sufrido el proceso de decapping. Esto sugiere que la reducción en la expresión de estos genes se debe, al menos en parte, a una inducción de la degradación de sus RNAs desencadenada por una pérdida de la estructura cap, contribuyendo así al empeoramiento de la función cardíaca tras MI (Figura 27B). Potencialmente, este proceso podría estar causado por la bajada de expresión de SRSF3. Sin embargo, al igual que ocurre con la mejora de función, tras un infarto de miocardio se producen muchos cambios a nivel molecular, independientes de la bajada de SRSF3, que podrían afectar entre otros al proceso de decapping. Sería interesante investigar si inhibiendo el proceso de decapping tras el infarto se podrían recuperar los niveles de expresión de los genes implicados en la contracción y como consecuencia mejorar la función cardíaca post-infarto.

En resumen, nuestros resultados muestran que SRSF3 es un factor esencial para el correcto funcionamiento y formación del corazón y la consecuente supervivencia de los animales. Hemos demostrado que SRSF3 se encuentra implicado en varios mecanismos moleculares en los cardiomiocitos, pero el esencial para la correcta contracción del corazón reside en la regulación del decapping de los mRNAs de los genes de contracción. Potencialmente, esta regulación estaría influenciada por su interacción con LSM14A. Hemos demostrado también cómo la pérdida de SRSF3 está implicada en el empeoramiento de la función cardíaca post-infarto y cómo la bajada de expresión de genes de contracción tras MI puede estar causada por un aumento del decapping de sus mRNAs. Todos estos resultados incrementan nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares que ocurren tras el MI y allana el camino para el desarrollo de nuevas terapias para tratar las enfermedades cardíacas.

CONCLUSIONES

1. La expresión de SRSF3 en el corazón comienza a E12.5 y disminuye con la edad.
2. La eliminación cardio-específica de SRSF3 durante el desarrollo es letal para los embriones, sugiriendo que SRSF3 es necesario para la correcta formación del corazón.
3. La eliminación de SRSF3 en corazones adultos conlleva la aparición de defectos de contracción y da lugar a la muerte de los animales en 8 días.
4. La pérdida de SRSF3 en los cardiomiocitos provoca una crítica reducción de expresión de los genes implicados en la contracción cardiaca.
5. La pérdida de SRSF3 en los cardiomiocitos conlleva un aumento de la proporción de mRNAs decapped de los genes implicados en la contracción. Su interacción con LSM14A podría estar implicada en este proceso.
6. La sobreexpresión de SERCA2A solo rescata parcialmente el fenotipo inducido por la pérdida de SRSF3.
7. La pérdida de SRSF3 está implicada, al menos parcialmente, en el empeoramiento de la función cardiaca post-infarto.
8. Tras el infarto de miocardio aumenta la proporción de mRNAs decapped de Serca2a y Ryr2.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, E. S. *et al.* (2012) 'The cardiotonic steroid digitoxin regulates alternative splicing through depletion of the splicing factors SRSF3 and TRA2B', *Rna*, 18(5), pp. 1041–1049. doi: 10.1261/rna.032912.112.
- Änkö, M. L. *et al.* (2012) 'The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes', *Genome Biology*. BioMed Central Ltd, 13(3), p. R17. doi: 10.1186/gb-2012-13-3-r17.
- Änkö, M. L. (2014) 'Regulation of gene expression programmes by serine-arginine rich splicing factors', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 32, pp. 11–21. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.03.011.
- Barth, A. S. *et al.* (2011) 'Reciprocal transcriptional regulation of metabolic and signaling pathways correlates with disease severity in heart failure', *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(5), pp. 475–483. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.957571.
- Brand, N. J. *et al.* (2010) 'Analysis of Cardiac Myocyte Biology in Transgenic Mice: A Protocol for Preparation of Neonatal Mouse Cardiac Myocyte Cultures', *Methods in Molecular Biology*, 633, pp. 113–124. doi: 10.1007/978-1-59745-019-5.
- De Bruin, R. G. *et al.* (2017) 'Emerging roles for RNA-binding proteins as effectors and regulators of cardiovascular disease', *European Heart Journal*, 38(18), pp. 1380–1388. doi: 10.1093/eurheartj/ehw567.
- Busà, R. *et al.* (2007) 'The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells', *Oncogene*, 26(30), pp. 4372–4382. doi: 10.1038/sj.onc.1210224.
- Byrne, M. J. *et al.* (2008) 'Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large

- animals', *Gene Therapy*, 15(23), pp. 1550–1557. doi: 10.1038/gt.2008.120.
- Cáceres, J. F., Screatton, G. R. and Krainer, A. R. (1998) 'A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm', *Genes and Development*, 12(1), pp. 55–66. doi: 10.1101/gad.12.1.55.
- Cartegni, L. and Krainer, A. R. (2002) 'Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN', *Nature Genetics*, 30(4), pp. 377–384. doi: 10.1038/ng854.
- Chang, Y.-L. *et al.* (2017) 'Theophylline exhibits anti-cancer activity via suppressing SRSF3 in cervical and breast cancer cell lines', *Oncotarget*, 8(60), pp. 101461–101474. doi: 10.18632/oncotarget.21464.
- Chang, Y.-L. *et al.* (2018) 'Amiodarone promotes cancer cell death through elevated truncated SRSF3 and downregulation of miR-224', *Oncotarget*, 9(17), pp. 13390–13406. doi: 10.18632/oncotarget.24385.
- Cho, S. *et al.* (2011) 'Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), pp. 8233–8238. doi: 10.1073/pnas.1017700108.
- Corbo, C., Orrù, S. and Salvatore, F. (2013) 'SRp20: An overview of its role in human diseases', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 436(1), pp. 1–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.027.
- Ding, J. *et al.* (2015) 'Trbp regulates heart function through microRNA-mediated Sox6 repression', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 47(7), pp. 776–783. doi: 10.1038/ng.3324.
- Ding, J. H. *et al.* (2004) 'Dilated cardiomyopathy caused by tissue-specific ablation of SC35 in the heart', *EMBO Journal*, 23(4), pp. 885–896. doi: 10.1038/sj.emboj.7600054.
- Feng, Y. *et al.* (2009) 'SRp38 Regulates Alternative Splicing and Is Required for

- Ca²⁺ Handling in the Embryonic Heart', *Developmental Cell*. Elsevier Ltd, 16(4), pp. 528–538. doi: 10.1016/j.devcel.2009.02.009.
- Freyermuth, F. et al. (2016) 'Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy', *Nature Communications*, 48(7), pp. 829–834. doi: 10.1038/pj.2016.37.
- Fromm, S. A. et al. (2012) 'The structural basis of Edc3-and Scd6-mediated activation of the Dcp1:Dcp2 mRNA decapping complex', *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 31(2), pp. 279–290. doi: 10.1038/emboj.2011.408.
- Gagliardi, M. and Matarazzo, M. R. (2016) 'RIP: RNA Immunoprecipitation', *Methods in Molecular Biology*, 1480, pp. 73–86. doi: 10.1007/978-1-4939-6380-5.
- Gao, C. et al. (2016) 'RBFox1-mediated RNA splicing regulates cardiac hypertrophy and heart failure', *The Journal of Clinical Investigation*, 126(1), pp. 195–206. doi: 10.1172/JCI84015DS1.
- Garber, K. B., Visootsak, J. and Warren, S. T. (2008) 'Fragile X syndrome', *European Journal of Human Genetics*, 16(6), pp. 666–672. doi: 10.1038/ejhg.2008.61.
- Gerstberger, S., Hafner, M. and Tuschl, T. (2014) 'A census of human RNA-binding proteins', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 15(12), pp. 829–845. doi: 10.1038/nrg3813.
- Ghigna, C. et al. (2005) 'Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene', *Molecular Cell*, 20(6), pp. 881–890. doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.026.
- Glisovic, T. et al. (2008) 'RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation', *FEBS Letters*, 582(14), pp. 1977–1986. doi: 10.1016/j.febslet.2008.03.004.
- Gonçalves, V., Matos, P. and Jordan, P. (2009) 'Antagonistic SR proteins regulate alternative splicing of tumor-related Rac1b downstream of the PI3-kinase and

- Wnt pathways', *Human Molecular Genetics*, 18(19), pp. 3696–3707. doi: 10.1093/hmg/ddp317.
- Gramlich, M. *et al.* (2015) 'Antisense-mediated exon skipping: a therapeutic strategy for titin-based dilated cardiomyopathy', *EMBO Molecular Medicine*, 7(5), pp. 562–576. doi: 10.15252/emmm.201505047.
- Guo, W. *et al.* (2012) 'RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing', *Nature Medicine*, 18(5), pp. 766–773. doi: 10.1038/nm.2693.
- Hammoudi, N., Ishikawa, K. and Hajjar, R. J. (2015) 'Adeno-associated virus-mediated gene therapy in cardiovascular disease', *Current Opinion in Cardiology*, 30(3), pp. 228–234. doi: 10.1097/HCO.0000000000000159.
- He, X. *et al.* (2011) 'Knockdown of splicing factor SRp20 causes apoptosis in ovarian cancer cells and its expression is associated with malignancy of epithelial ovarian cancer', *Oncogene*, 30(3), pp. 356–365. doi: 10.1038/onc.2010.426.Knockdown.
- Heineke, J. and Molkentin, J. D. (2006) 'Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8), pp. 589–600. doi: 10.1038/nrm1983.
- Hentze, M. W. *et al.* (2018) 'A brave new world of RNA-binding proteins', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrm.2017.130.
- Houseley, J. and Tollervey, D. (2009) 'The Many Pathways of RNA Degradation', *Cell*. Elsevier Inc., 136(4), pp. 763–776. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.019.
- Huang, C. S. *et al.* (2007) 'Increased expression of SRp40 affecting CD44 splicing is associated with the clinical outcome of lymph node metastasis in human breast cancer', *Clinica Chimica Acta*, 384(1–2), pp. 69–74. doi: 10.1016/j.cca.2007.06.001.
- Huang, Y. and Steitz, J. A. (2001) 'Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the

- nucleocytoplasmic export of mRNA', *Molecular Cell*, 7(4), pp. 899–905. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00233-7.
- Jia, R. *et al.* (2010) 'SRp20 is a proto-oncogene critical for cell proliferation and tumor induction and maintenance', *International Journal of Biological Sciences*, 6(7), pp. 806–826. doi: 10.7150/ijbs.6.806.
- Jin, P., Alisch, R. S. and Warren, S. T. (2004) 'RNA and microRNAs in fragile X mental retardation', *Nature Cell Biology*, 6(11), pp. 1048–1053. doi: 10.1038/ncb1104-1048.
- Jumaa, H., Guenet, J. L. and Nielsen, P. J. (1997) 'Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle', *Molecular and Cellular Biology*, 17(6), pp. 3116–3124.
- Jumaa, H. and Nielsen, P. J. (1997) 'The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation', *EMBO Journal*, 16(16), pp. 5077–5085. doi: 10.1093/emboj/16.16.5077.
- Jumaa, H., Wei, G. and Nielsen, P. J. (1999) 'Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20', *Current Biology*, 9(16), pp. 899–902. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80394-7.
- Kano, S. *et al.* (2013) 'Truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 accelerates cell growth through up-regulating c-Jun expression', *The Journal of Medical Investigation*, 60(2), pp. 228–235. doi: 10.2152/jmi.60.228.
- Kano, S. *et al.* (2014) 'Oxidative stress-inducible truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 regulates interleukin-8 production in human colon cancer cells', *AJP: Cell Physiology*, 306(3), pp. C250–C262. doi: 10.1152/ajpcell.00091.2013.
- Karikó, K. *et al.* (2005) 'Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA', *Immunity*, 23(2), pp. 165–175. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
- Karni, R. *et al.* (2007) 'The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-

- oncogene', *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(3), pp. 185–193. doi: 10.1038/nsmb1209.
- Kawase, Y. and Hajjar, R. J. (2008) 'The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: A potent target for cardiovascular diseases', *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5(9), pp. 554–565. doi: 10.1038/ncpcardio1301.
- Kim, J. *et al.* (2014) 'Splicing factor SRSF3 represses the translation of programmed cell death 4 mRNA by associating with the 5'-UTR region', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 21(3), pp. 481–490. doi: 10.1038/cdd.2013.171.
- King, C. E. *et al.* (2011) 'LIN28B promotes colon cancer progression and metastasis', *Cancer Research*, 71(12), pp. 4260–4268. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4637.
- Kurokawa, K. *et al.* (2014) 'Downregulation of serine/arginine-rich splicing factor 3 induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 33(11), pp. 1407–1417. doi: 10.1038/onc.2013.86.
- de la Mata, M. and Kornblihtt, A. R. (2006) 'RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20', *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(11), pp. 973–980. doi: 10.1038/nsmb1155.
- Lejeune, F. and Maquat, L. E. (2005) 'Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells', *Current Opinion in Cell Biology*, 17(3), pp. 309–315. doi: 10.1016/j.ceb.2005.03.002.
- Lemaire, R. *et al.* (2002) 'Stability of a PKCI-1 -related mRNA is controlled by the splicing factor ASF / SF2: a novel function for SR proteins', *Genes & Development*, 16, pp. 594–607. doi: 10.1101/gad.939502.SR.
- Li, D. *et al.* (2010) 'Identification of novel mutations in RBM20 in patients with dilated cardiomyopathy', *Clinical and Translational Science*, 3(3), pp. 90–97.

doi: 10.1111/j.1752-8062.2010.00198.x.

- Li, Y. *et al.* (2012) 'Dcp2 Decapping Protein Modulates mRNA Stability of the Critical Interferon Regulatory Factor (IRF) IRF-7', *Molecular and Cellular Biology*, 32(6), pp. 1164–1172. doi: 10.1128/MCB.06328-11.
- Li, Y. and Kiledjian, M. (2010) 'Regulation of mRNA decapping', *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1(2), pp. 253–265. doi: 10.1002/wrna.15.
- Lipskaia, L. *et al.* (2011) 'Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase as a therapeutic target for heart failure', *Expert Opin Biol Ther.*, 10(1), pp. 29–41. doi: 10.1517/14712590903321462.Sarcoplasmic.
- Lopez-Mejia, I. C. *et al.* (2011) 'A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging', *Human Molecular Genetics*, 20(23), pp. 4540–4555. doi: 10.1093/hmg/ddr385.
- Lukong, K. E. *et al.* (2008) 'RNA-binding proteins in human genetic disease', *Trends in Genetics*, 24(8), pp. 416–425. doi: 10.1016/j.tig.2008.05.004.
- Mandal, P. K. and Rossi, D. J. (2013) 'Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA', *Nature Protocols*, 8(3), pp. 568–582. doi: 10.1038/nprot.nprot.2013.019.
- Manley, J. L. and Krainer, A. R. (2010) 'A rational nomenclature for serine / arginine-rich protein splicing factors (SR proteins)', *Genes & Development*, 24, pp. 1073–1074. doi: 10.1101/gad.1934910.apparent.
- del Monte, F. *et al.* (2001) 'Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in a rat model of heart failure', *Circulation*, 104, pp. 1424–1429. doi: 10.1161/hc3601.095574.
- Moura-Alves, P. *et al.* (2011) 'An shRNA-based screen of splicing regulators identifies SFRS3 as a negative regulator of IL-1 β secretion', *PLoS ONE*, 6(5), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0019829.

- Müller-McNicoll, M. *et al.* (2016) 'SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export', *Genes and Development*, 30(5), pp. 553–566. doi: 10.1101/gad.276477.115.
- Nus, M. *et al.* (2016) 'Endothelial Jag1-RBPJ signalling promotes inflammatory leucocyte recruitment and atherosclerosis', *Cardiovascular Research*, 112(2), pp. 568–580. doi: 10.1093/cvr/cvw193.
- Olshavsky, N. A. *et al.* (2010) 'Identification of ASF/SF2 as a critical, allele-specific effector of the cyclin D1b oncogene', *Cancer Research*, 70(10), pp. 3975–3984. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3468.
- Pandit, S. *et al.* (2013) 'Genome-wide Analysis Reveals SR Protein Cooperation and Competition in Regulated Splicing', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 50(2), pp. 223–235. doi: 10.1016/j.molcel.2013.03.001.
- Paronetto, M. P. *et al.* (2010) 'Alternative splicing of the cyclin D1 proto-oncogene is regulated by the RNA-binding protein Sam68', *Cancer Research*, 70(1), pp. 229–239. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2788.
- Pelechano, V., Wei, W. and Steinmetz, L. M. (2016) 'Genome-wide quantification of 5'-phosphorylated mRNA degradation intermediates for analysis of ribosome dynamics', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 11(2), pp. 359–376. doi: 10.1038/nprot.2016.026.
- Pereira, B., Billaud, M. and Almeida, R. (2017) 'RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors', *Trends in Cancer*. Elsevier Inc., 3(7), pp. 506–528. doi: 10.1016/j.trecan.2017.05.003.
- Pihlajamäki, J. *et al.* (2011) 'Expression of the splicing factor gene SFRS10 is reduced in human obesity and contributes to enhanced lipogenesis', *Cell Metabolism*, 14(2), pp. 208–218. doi: 10.1016/j.cmet.2011.06.007.
- Pind, M. T. and Watson, P. H. (2003) 'SR protein expression and CD44 splicing pattern in human breast tumours', *Breast Cancer Res Treat*, 79, pp. 75–82. doi:

10.1023/A:1023338718974.

- Ram, R. *et al.* (2011) 'New approaches in small animal echocardiography: imaging the sounds of silence', *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 301(5), pp. H1765–H1780. doi: 10.1152/ajpheart.00559.2011.
- Rambout, X. *et al.* (2016) 'The transcription factor ERG recruits CCR4-NOT to control mRNA decay and mitotic progression', *Nature Structural and Molecular Biology*, 23(7), pp. 663–672. doi: 10.1038/nsmb.3243.
- Ring, H. Z. and Lis, J. T. (1994) 'The SR Protein B52 / SRp55 Is Essential for Drosophila Development', 14(11), pp. 7499–7506.
- Roth, M. B., Murphy, C. and Gall, J. G. (1990) 'A monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope stains lampbrush chromosome loops and small granules in the amphibian germinal vesicle', *Journal of Cell Biology*, 111(6 I), pp. 2217–2223. doi: 10.1083/jcb.111.6.2217.
- Ruijter, J. M. *et al.* (2009) 'Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data', *Nucleic Acids Research*, 37(6). doi: 10.1093/nar/gkp045.
- Sallinen, P. *et al.* (2007) 'Time course of changes in the expression of DHPR, RyR2, and SERCA2 after myocardial infarction in the rat left ventricle', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 303(1–2), pp. 97–103. doi: 10.1007/s11010-007-9460-3.
- Sapra, A. K. *et al.* (2009) 'SR Protein Family Members Display Diverse Activities in the Formation of Nascent and Mature mRNPs In Vivo', *Molecular Cell*, 34(2), pp. 179–190. doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.031.
- Sen, S. *et al.* (2015) 'Deletion of Splicing Factor SRSF3 in Hepatocytes Predisposes to Hepatocellular Carcinoma in Mice', *Hepatology*, 61(1), pp. 171–183. doi: 10.1002/hep.27380.
- Sen, S., Jumaa, H. and Webster, N. J. G. (2013) 'Splicing factor SRSF3 is crucial for

- hepatocyte differentiation and metabolic function', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4(May 2012), pp. 1312–1336. doi: 10.1038/ncomms2342.
- Sen, S., Talukdar, I. and Webster, N. J. G. (2009) 'SRp20 and CUG-BP1 Modulate Insulin Receptor Exon 11 Alternative Splicing', *Molecular and Cellular Biology*, 29(3), pp. 871–880. doi: 10.1128/MCB.01709-08.
- Shen, H., Kan, J. L. C. and Green, M. R. (2004) 'Arginine-Serine-Rich Domains Bound at Splicing Enhancers Contact the Branchpoint to Promote Prespliceosome Assembly', *Molecular Cell*, 13(3), pp. 367–376. doi: 10.1016/S1097-2765(04)00025-5.
- Shi, J. *et al.* (2008) 'Caffeine Regulates Alternative Splicing in a Subset of Cancer-Associated Genes: a Role for SC35', *Molecular and Cellular Biology*, 28(2), pp. 883–895. doi: 10.1128/MCB.01345-07.
- Silipo, M., Gautrey, H. and Tyson-Capper, A. (2015) 'Deregulation of splicing factors and breast cancer development', *J Mol Cell Biol*, 7(March), pp. 388–401. doi: 10.1093/jmcb/mjv027.
- Singh, G. *et al.* (2012) 'The cellular EJC interactome reveals higher-order mRNP structure and an EJC-SR protein nexus', *Cell*. Elsevier Inc., 151(4), pp. 750–764. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.007.
- Sun, S. *et al.* (2010) 'SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control', *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 17(3), pp. 306–312. doi: 10.1038/nsmb.1750.
- Sureau, A. *et al.* (2001) 'SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs', *EMBO Journal*, 20(7), pp. 1785–1796. doi: 10.1093/emboj/20.7.1785.
- Szklarczyk, D. *et al.* (2017) 'The STRING database in 2017: Quality-controlled

- protein-protein association networks, made broadly accessible', *Nucleic Acids Research*, 45(D1), pp. D362–D368. doi: 10.1093/nar/gkw937.
- Tang, Y. *et al.* (2013) 'Downregulation of splicing factor SRSF3 induces p53 β , an alternatively spliced isoform of p53 that promotes cellular senescence', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 32(22), pp. 2792–2798. doi: 10.1038/onc.2012.288.
- Thum, T. *et al.* (2007) 'MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure', *Circulation*, 116(3), pp. 258–267. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.687947.
- Wang, H.-Y. *et al.* (2001) 'SC35 Plays a Role in T Cell Development and Alternative Splicing of CD45', *Molecular Cell*, 7(2), pp. 331–342. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00181-2.
- Wang, J., Takagaki, Y. and Manley, J. L. (1996) 'Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF / SF2 is required for cell viability', pp. 2588–2599.
- Warren, L. *et al.* (2010) 'Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA', *Cell Stem Cell*, 7(5), pp. 618–630. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.012.
- Watermann, D. O. *et al.* (2006) 'Splicing factor Tra2- β 1 is specifically induced in breast cancer and regulates alternative splicing of the CD44 gene', *Cancer Research*, 66(9), pp. 4774–4780. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3294.
- Wei, C. *et al.* (2015) 'Repression of the central splicing regulator RBFOX2 is functionally linked to pressure overload-induced heart failure', *Cell Reports*, 10(9), pp. 1521–1533. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.013.
- WHO (2017) 'Cardiovascular Diseases (CVDs)', p. [Online].
- Wilkins, E. *et al.* (2017) 'European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition', *European Heart Network, Brussels*, p. 192. doi: 978-2-9537898-1-2.

- Wong, J. *et al.* (2012) 'Srp20 regulates TrkB pre-mRNA splicing to generate TrkB-Shc transcripts with implications for Alzheimer's disease', *Journal of Neurochemistry*, 123(1), pp. 159–171. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07873.x.
- Wu, S. *et al.* (2014) 'The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution', *Blood*, 120(15), pp. 3106–3112. doi: 10.1182/blood-2012-02-412296.The.
- Xu, X. *et al.* (2005) 'ASF/SF2-regulated CaMKII δ alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle', *Cell*, 120(1), pp. 59–72. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.036.
- Ye, J. *et al.* (2015) 'hnRNP U protein is required for normal pre-mRNA splicing and postnatal heart development and function', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(23), pp. E3020–E3029. doi: 10.1073/pnas.1508461112.
- Yu, Q., Guo, J. and Zhou, J. (2004) 'A minimal length between tau exon 10 and 11 is required for correct splicing of exon 10', *Journal of Neurochemistry*, 90(1), pp. 164–172. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02477.x.
- Zhong, X. Y. *et al.* (2009) 'SR Proteins in Vertical Integration of Gene Expression from Transcription to RNA Processing to Translation', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 35(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.molcel.2009.06.016.
- Zhou, Z. and Fu, X. D. (2013) 'Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases', *Chromosoma*, 122(3), pp. 191–207. doi: 10.1007/s00412-013-0407-z.

MATERIAL SUPLEMENTARIO: TABLAS

Tabla Suplementaria 1. Análisis de diferencia de expresión génica en corazones de ratones SRSF3 KO. Se encuentra incluida en el CD adjuntado con esta Tesis Doctoral.

Tabla Suplementaria 2. Cuantificación de proteínas que interaccionan con SRSF3.

ID	Gen	SRSF3-GFP (nº péptidos identificados)	GFP (nº péptidos identificados)
Q8VDD5	Myh9	118	37
Q61879	Myh10	81	22
B2RQQ1	Myh6	62	32
Q99PL5	Rrbp1	36	14
P11276	Fn1	20	4
Q8BMK4	Ckap4	32	18
Q8CGC7	Eprs	16	5
Q8VCQ8	Cald1	11	
Q5M9N8	Rpl7	20	10
Q9WTI7	Myo1c	10	1
P62737	Acta2	32	24
Q545Y3	Tpm1	21	13
Q922B2	Dars	13	5
B2RRX1	Actb	12	4
Q7TPW1	Nexn	11	3
Q5YLW3	Rps3	15	9
Q6ZWN5	Rps9	13	7
B2RTM0	Hist2h4	13	7
P20029	Hspa5	8	2
P84104	Srsf3	6	
Q3UCH0	Rpl6	14	9
P11087	Col1a1	5	
Q61595	Ktn1	5	
Q5SX40	Myh1	15	11
Q564E8	Rpl4	15	11
Q8VEK3	Hnrnpu	14	10
P97855	G3bp1	9	5
B2RXX9	Myh7	9	5
P09405	Ncl	8	4
Q9D0I9	Rars	8	4
A2AM97	RP23-436K3.4-001	8	4
Q54AB6	Tnnt2	8	4
P09542	Myl3	7	3
Q8BU30	Iars	7	3
Q58DZ3	Rpl30	7	3
Q58EU6	Rpl5	7	3
Q5I0T8	Rpl19	7	3

Q5SX39	Myh4	6	2
O08638	Myh11	5	1
Q68FL6	Mars	5	1
Q9D0E1	Hnrnpm	5	1
Q3UBT1	Ybx1	5	1
Q5M9K9	Rpl31	5	1
P62911	Rpl32	4	
Q80X19	Col14a1	4	
Q8K2F8	Lsm14a	4	
Q3U2W2	Mybbp1a	4	
Q8VIJ6	Sfpq	13	10
Q545X8	Rps4x	13	10
A4FUS1	Rps16	10	7
O09167	Rpl21	7	4
P62830	Rpl23	7	4
Q6ZWY9	Hist1h2bc	7	4
P62717	Rpl18a	6	3
Q9CXW4	Rpl11	6	3
Q58EU3	Rps2	6	3
Q5M9M7	Rps24	5	2
Q6PHZ1	Rpl17	5	2
Q5XJF6	Rpl10a	4	1
Q6ZWZ4	Rpl36	4	1
P31230	Aimp1	3	
P35441	Thbs1	3	
Q8R0X7	Sgpl1	3	
Q542G9	Anxa2	3	
Q545T7	Myl1	3	
Q58ET1	Rpl7a	14	12
P47963	Rpl13	11	9
Q9CZX8	Rps19	10	8
Q497E9	Rps8	9	7
P62918	Rpl8	8	6
Q60865	Caprin1	7	5
Q61545	Ewsr1	7	5
Q5BLJ9	Rpl27	7	5
Q5M8R8	Rplp0	7	5
Q55ZA3	Hist1h1c	7	5
P61979	Hnrnpk	6	4
Q60605	Myl6	6	4
Q58EA6	Rps25	6	4
P63017	Hspa8	5	3
Q3THE2	Myl12b	5	3
B2RVF0	Hist1h2ad	5	3
Q4FZE6	Rps7	5	3
Q5FWJ3	Vim	5	3
Q5M9M0	Rpl13a	5	3
O54724	Ptrf	4	2
P14115	Rpl27a	4	2
P51667	Myl2	4	2
Q60749	Khdrbs1	4	2
Q9DB20	Atp5o	4	2
Q52KP0	Rpl38	4	2
P10922	H1f0	3	1
P19123	Tnnc1	3	1
Q6ZPZ3	Zc3h4	3	1
Q8BFR5	Tufm	3	1
Q059I1	Rps28	3	1
P13020	Gsn	2	
P19324	Serpinh1	2	
P29268	Ctgf	2	
P46735	Myo1b	2	
Q8BI06	Cemip	2	
Q8K370	Acad10	2	
Q9CYL5	Glpr2	2	
Q9JMH9	Myo18a	2	
Q9QXS1	Plec	2	
B2RVF5	H2afv	2	
D2KHZ9	GAPDH	2	
Q499X7	Coro1c	2	
Q5EBP9	Trim28	2	

Q5FWI9	Ap2m1	2	
Q80Y52	Hsp90aa1	2	
Q501J6	Ddx17	14	13
Q4FZH2	Rpl26	13	12
P02535	Krt10	11	10
Q564F3	Rps3a1	11	10
P62264	Rps14	9	8
Q5M9M5	Rpl23a	9	8
Q5BLK1	Rps6	8	7
Q5M8Q0	Rpl15	8	7
Q5M9M4	Rps15a	7	6
P56480	Atp5b	5	4
Q6ZVV7	Rpl35	5	4
Q8BP67	Rpl24	5	4
Q497F1	Tnni3	5	4
Q5M9J8	Rpl28	5	4
Q3TIV6	Kars	4	3
Q4FJK0	Decr1	4	3
Q5M8M8	Rpl29	4	3
P62843	Rps15	3	2
P62862	Fau	3	2
P97461	Rps5	3	2
P99027	Rplp2	3	2
Q9CQ69	Uqcrq	3	2
Q9D1R9	Rpl34	3	2
Q497N1	Rps26	3	2
Q5BLK0	Rpl12	3	2
O70373	Xirp1	2	1
P17156	Hspa2	2	1
P43274	Hist1h1e	2	1
P57776	Eef1d	2	1
P58774	Tpm2	2	1
Q8R010	Aimp2	2	1
Q8R326	Pspc1	2	1
Q99PU8	Dhx30	2	1
Q9WUZ5	Tnni1	2	1
G3X922	Dnajc13	2	1
Q3TQX5	Ddx3x	2	1
Q7TSZ3	Lars	2	1
Q4FK11	Nono	17	17
Q58EW0	Rpl18	9	9
P29341	Pabpc1	7	7
Q3TTY5	Krt2	7	7
P27659	Rpl3	6	6
Q61584	Fxr1	6	6
Q9CR57	Rpl14	6	6
Q3UD06	Atp5c1	6	6
Q5BLJ7	Rps13	6	6
P43276	Hist1h1b	5	5
Q8BMS1	Hadha	5	5
Q3V1K9	Des	5	5
P43275	Hist1h1a	4	4
P68433	Hist1h3a	4	4
Q5M9K3	Uba52	4	4
Q9CQF3	Nudt21	3	3
Q0VGU9	Rbm39	3	3
Q3U541	G3bp2	3	3
Q5BLK2	Rps20	3	3
O88569	Hnrnpa2b1	2	2
P04104	Krt1	2	2
P35922	Fmr1	2	2
P57784	Snrpa1	2	2
Q6NVF9	Cpsf6	2	2
Q8BX10	Pgam5	2	2
Q924X2	Cpt1b	2	2
Q08EK5	Krt77	2	2
Q3TU85	Hspa1b	2	2
Q3UBP6	Actb	2	2
Q5M9L7	Rps17	2	2
Q91YZ8	Pabpc4	2	2
Q9CQ73	Pkp2	2	2

Q9QZ83	Actg1	2	2
Q03265	Atp5a1	9	10
P48962	Slc25a4	8	9
Q3UC02	Rps11	6	7
Q564D0	Fus	6	7
Q80X50	Ubap2l	4	5
P08730	Krt13	3	4
P50446	Krt6a	3	4
Q3UV17	Krt76	3	4
Q7TMM9	Tubb2a	3	4
Q91VR5	Ddx1	3	4
Q545A2	Slc25a5	3	4
P38647	Hspa9	2	3
Q3SYP5	Krt16	2	3
Q4VAG4	Rpl22	2	3
Q58E64	Eef1a1	2	3
Q5EBQ6	Rpl9	2	3
Q6ZWX1	Rpl35a	2	3
P14206	Rpsa	1	2
P17426	Ap2a1	1	2
P70372	Elavl1	1	2
Q7TQH0	Atxn2l	1	2
Q9WV02	RbmX	1	2
Q4VA29	2700060E02Rik	1	2
Q4VAF2	Rpl37a	1	2
Q5SX53	Slc25a11	1	2
Q561N5	Rps18	10	12
Q99LF4	Rtcb	7	9
B9EIA2	D1Pas1	7	9
P68369	Tuba1a	5	7
Q32P04	Krt5	4	6
P62267	Rps23	3	5
Q9CY58	Serbp1	3	5
Q6IFX2	Krt42	1	3
Q99JY0	Hadhb	1	3
B2RXQ8	Wdr82	1	3
Q3TLH4	Prcc2c		2
Q3UM18	Lsg1		2
Q9D1I6	Mrpl14		2
Q9DB77	Uqcrc2		2
Q9DCT2	Ndufs3		2
Q9ERD7	Tubb3		2
Q3UN87	Snrpn		2
Q61781	Krt14	3	6
Q7TMK9	Syncrrip	2	5
Q3TJZ6	Fam98a	1	4
Q3UTJ2	Sorbs2		3
Q8BTV2	Cpsf7		3
Q61656	Ddx5	8	12
Q925I1	Atad3	2	6

MATERIAL SUPLEMENTARIO: PUBLICACIONES

Actualmente se encuentra en preparación el siguiente manuscrito:

P. Ortiz-Sánchez; M. Villalba; F. Sánchez-Cabo; C. Martí-Gómez; MM. López-Olañeta; J. Larrasa-Alonso; JM. Gómez-Salineró; E. Lara-Pezzi. "SRSF3 cardio-specific depletion induces decapping leading to animal death while its overexpression improves heart function after myocardial infarction"

Durante esta Tesis Doctoral se ha contribuido a las siguientes publicaciones:

- L. Padrón-Barthe, M. Villalba-Orero, JM. Gómez-Salineró, M. Román, J. Larrasa-Alonso, **P. Ortiz-Sánchez**, F. Martínez, MM López-Olañeta, E. Bonzón-Kulichenko, J. Vázquez, F. Domínguez, P. García-Pavía and E. Lara-Pezzi. "Severe cardiac dysfunction and death caused by ARVC type 5 is improved by calcineurin α 1: insight from a new mouse model". *Submitted*.
- L. Padrón-Barthe, M. Villalba-Orero, JM. Gómez-Salineró, R. Acín-Pérez, S. Cogliati, MM López-Olañeta, **P. Ortiz-Sánchez**, E. Bonzón-Kulichenko, J. Vázquez, P. García-Pavía, N. Rosenthal, JA. Enríquez and E. Lara-Pezzi. "Activation of serine-one-carbon metabolism by calcineurin α 1 reduces cardiac hypertrophy and improves function". *JACC*. 2018, Feb 13;71(6):654-667.
- JM. Gómez-Salineró, MM. López-Olañeta, **P. Ortiz-Sánchez**, J. Larrasa-Alonso, A. Gatto, LE. Felkin, PJR. Barton, I. Navarro-Lérida, MA. del Pozo, P. García-Pavía, B. Sundararaman, G. Giovina, GW. Yeo and E. Lara-Pezzi. "The Calcineurin Variant Cn α 1 Controls Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation by Directing mTORC2 Membrane Localization and Activation". *Cell Chem Biol*. 2016, 23(11):1372-82.
- MM. López-Olañeta, M. Villalba, JM. Gómez-Salineró, LJ. Jiménez-Borreguero, R. Breckenridge, **P. Ortiz-Sánchez**, P. García-Pavía, B. Ibáñez and E. Lara-Pezzi. "Induction of the calcineurin variant Cn α 1 after myocardial infarction reduces post-infarction ventricular remodelling by promoting infarct vascularization". *Cardiovasc. Res*. 2014. Jun 1;102(3):396-406.

